

CARACTÉRISATION DU TRANSFERT D'ICEBSI EN FONCTION DE LA
FORMATION DE BIOFILM

par

Frédéric Lécuyer

Mémoire présenté au Département de biologie en vue
de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

FACULTÉ DES SCIENCES
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, Canada, mai 2019

Le 1 mai 2019

le jury a accepté le mémoire de Monsieur Frédéric Lécuyer
dans sa version finale.

Membres du jury

Professeure Pascale Beauregard

Directrice de recherche

Département de biologie

Professeur Vincent Burrus

Codirecteur de recherche

Département de biologie

Professeur François Malouin

Évaluateur interne

Département de biologie

Professeur Sébastien Rodrigue

Président-rapporteur

Département de biologie

SOMMAIRE

La résistance aux antibiotiques est un problème pour le milieu clinique et agricole générant de plus en plus d'inquiétude à l'échelle mondiale. Ce problème est exacerbé par le manque de développement de nouvelles classes d'antibiotiques au cours des trois dernières décennies. Les résistances aux antibiotiques sont principalement acquises par des éléments génétiques mobiles. Parmi ces éléments, on retrouve les éléments intégratifs et conjugatifs (ICEs). Un autre aspect intervenant lors d'infections bactériennes est la formation de biofilm. En effet, une majorité des infections chroniques sont causées par des bactéries retrouvées sous forme de biofilm. Il a déjà été démontré que le biofilm était considéré comme un environnement favorisant le transfert de plasmides conjugatifs, mais son impact réel n'a jamais été quantifié. Par ailleurs, le transfert des ICEs en biofilm n'a jamais été caractérisé et la manière dont le biofilm aurait un effet sur le transfert conjugatif n'a jamais été élucidée.

Dans cette étude, pour répondre à ces questions, nous avons utilisé le microorganisme modèle *Bacillus subtilis*, une rhizobactérie à Gram positif. *B. subtilis* forme un biofilm robuste en plus d'être l'hôte d'un ICE nommé ICEBsI. Nous avons pu démontrer que la formation de biofilm amenait environ 100 à 10 000 fois plus de transfert d'ICEBsI, que ce soit en milieu solide ou liquide. De plus, l'activation du transfert d'ICEBsI et de la formation de biofilm arrivent simultanément dans le temps. Nous avons également pu démontrer que l'augmentation du transfert d'ICEBsI était due à un meilleur contact cellule-cellule, médié par la production de matrice extracellulaire. Cette production de matrice extracellulaire doit provenir de la bactérie réceptrice afin d'avoir un transfert optimal d'ICEBsI. De plus, nous avons montré qu'ICEBsI était capable d'infiltrer un biofilm déjà établi.

En somme, ces travaux nous permettent de mieux comprendre le transfert d'ICEs en présence de biofilms. Comme nos travaux démontrent un transfert élevé d'ICEs en présence de biofilms, les connaissances acquises vont aussi être applicables à l'étude de différents ICEs chez les bactéries à Gram positif. En effet, ces ICEs sont historiquement connus comme ayant des taux de transferts très faibles comparativement à ceux retrouvés chez les bactéries à Gram négatif.

Mots clés : *Bacillus subtilis*, ICEBs1, biofilm, matrice extracellulaire, éléments intégratifs et conjugatifs

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier ma directrice Pascale B. Beauregard de m'avoir supervisé et supporté durant ma maîtrise, mais aussi durant mes stages et mes crédits de recherche dans le laboratoire. Elle m'a permis de vivre plusieurs expériences mémorables durant mon parcours, comme d'aller présenter mon projet à Seattle et d'écrire un article scientifique. Je voulais également remercier mon codirecteur Vincent Burrus pour ces excellentes contributions intellectuelles tout au long de ma maîtrise et lors de l'écriture de l'article scientifique. De plus, je voudrais remercier mes conseillers François Malouin et Sébastien Rodrigue pour leurs judicieux conseils et suggestions lors de mes comités de conseillers. Je voudrais aussi remercier les membres des laboratoires Burrus et Rodrigue pour les discussions et commentaires lors de nos *labs meetings* communs.

Je voulais aussi remercier mes collègues de laboratoire passés et présents pour leur bonne humeur, les discussions sur des sujets d'une pertinence scientifique variable, les nombreuses activités de labo auxquelles nous avons participé, ainsi que les différents déjeuners, dîners et soupers que nous avons partagés. Un merci particulier va à Jean-Sébastien Bourassa pour avoir optimisé et réalisé les expériences de qPCR lorsqu'il était sous ma supervision et à Martin Gélinas pour avoir commencé le projet qui allait devenir ce projet de maîtrise. Je voudrais aussi remercier ma famille qui m'a toujours soutenu et encouragé tout au long de mes études. Je voudrais aussi remercier Nintendo pour la qualité de leurs jeux, qui me permettent de me détendre quand je ne suis pas à l'université. Je voudrais aussi remercier le rhum Captain Morgan pour la même raison.

Côté financier, je tenais à remercier le FRQNT pour m'avoir octroyé une bourse de deuxième cycle qui a permis de couvrir mon salaire pour la quasi-totalité de ma maîtrise, ainsi que la Fondation de l'Université de Sherbrooke pour m'avoir octroyé la bourse D. F. Brown.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE	iv
REMERCIEMENTS	vi
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	x
LISTE DES TABLEAUX.....	xii
LISTE DES FIGURES	xiii
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
1.1 Le transfert horizontal de gènes	1
1.1.1 La conjugaison.....	2
1.1.1.1 Élément intégratif et conjugatif (ICE)	2
1.1.2 Les différences dans la conjugaison des bactéries à Gram positif et négatif.....	4
1.1.3 Le transfert horizontal de gène en biofilm.....	6
1.2 <i>Bacillus subtilis</i>	7
1.2.1 Le biofilm de <i>B. subtilis</i>	8
1.2.2 ICEBsI	12
1.3 Hypothèse de recherche et objectifs	16
CHAPITRE 2 : ARTICLE SCIENTIFIQUE	18
2.1 Introduction de la publication	18
2.1.1 Résumé de l'article	18
2.1.2 Originalité du travail.....	19
2.1.3 Contribution des auteurs	19
2.1.4 Référence de l'article.....	20
2.2 Manuscrit de l'article scientifique.....	21

2.2.1 Abstract.....	22
2.2.2 Importance	23
2.2.3 Introduction	24
2.2.4 Results	26
2.2.4.1 Biofilm enhances the conjugative transfer of <i>ICEBsI</i>	26
2.2.4.2 Biofilm allows for highly efficient conjugation in low donor/recipient ratio	29
2.2.4.3 Conjugation activation and biofilm formation are simultaneous.....	31
2.2.4.4 Biofilm formation does not alter excision of <i>ICEBsI</i>	32
2.2.4.5 Matrix production by recipient cells is important for optimum conjugation in biofilm.....	35
2.2.5 Discussion.....	37
2.2.6 Material and Methods	41
2.2.6.1 Strains and media	41
2.2.6.2 Strain construction	41
2.2.6.3 Mating assays	42
2.2.6.4 Flow cytometry	43
2.2.6.5 <i>ICEBsI</i> excision quantification.....	44
2.2.6.6 Stereomicroscopy.....	44
2.2.6.7 Statistical analyses	45
2.2.7 Acknowledgments	45
2.2.8 References	46
2.2.9 Supplementary Material	53
CHAPITRE 3 : L'INFILTRATION DU BIOFILM PAR <i>ICEBsI</i>	60

3.1 Matériel et méthodes	60
3.2 Résultats	61
3.2.1 ICEBsI peut infiltrer un biofilm déjà formé.....	61
3.2.2 La production de matrice par les cellules réceptrices est importante pour l'infiltration d'ICEBsI	63
3.2.3 La concentration de donneuses influence l'infiltration d'ICEBsI	64
CHAPITRE 4 : DISCUSSION ET CONCLUSION GÉNÉRALE.....	66
4.1 L'importance des exopolysaccharides	66
4.2 Régulation commune entre la formation de biofilm et le transfert d'ICEBsI	66
4.3 Infiltration du biofilm.....	67
4.4 Perspectives et conclusions	68
BIBLIOGRAPHIE	71

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ICE : Élément intégratif et conjugatif (*Integrative and conjugative element*)

HGT : Transfert horizontal de gène (*Horizontal gene transfer*)

ADN : Acide désoxyribonucléique

MGE : Élément génétique mobile (*Mobile genetic element*)

T4SS : Système de sécrétion de type IV (*Type IV secretion system*)

ADN-T : ADN de transfert

Kb : Kilobase

DO₆₀₀ ou OD₆₀₀ : Densité optique à 600 nm

nm : Nanomètre

qPCR : *quantitative polymerase chain reaction*

oriT : origine de transfert

h : Heure

ICEBsI⁰ : Souche n'ayant pas ICEBsI

LBGM : *Lysogeny broth glycerol manganese*

MSgg : *Minimal salts glycerol glutamate*

LB : *Lysogeny broth*

MSNc : *Minimal salts nitrogen cellulose*

% : Pourcent

WT : *Wild type*

°C : Degré Celcius

SEM : *Standard error of the mean*

yfp : *yellow fluorescent protein*

Kan : Kanamycine

Cat : Chloramphénicol

mM : Millimolaire

μM : Micromolaire

pH : Pouvoir hydrogène

μg : Microgramme

ml : Millilitre

PCR : *Polymérase chain reaction*

μl : Microlitre

Ct : *cycle threshold*

mm : Millimètre

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE 2 : ARTICLE SCIENTIFIQUE

Table S1.	<i>recA</i> and WT donors cells count after 20 h.....	57
Table S2.	<i>Bacillus subtilis</i> strains used.....	57
Table S3.	Donor and recipient cell counts in different media after 20 h.....	59

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION GÉNÉRALE

Figure 1.1.	Cycle de vie normal d'un ICE	4
Figure 1.2.	Structure typique du T4SS chez les bactéries à Gram négatif et positif.....	5
Figure 1.3.	La régulation de la formation de biofilm chez <i>B. subtilis</i>	11
Figure 1.4.	Arrangement génétique d' <i>ICEBsI</i>	12
Figure 1.5.	La régulation de l'excision et du transfert d' <i>ICEBsI</i>	14

CHAPITRE 2 : ARTICLE SCIENTIFIQUE

Figure 2.1.	Biofilm formation enhances <i>ICEBsI</i> transfer.....	28
Figure 2.2.	Lower donor/recipient ratio allows increased <i>ICEBsI</i> transfer in biofilm.....	30
Figure 2.3.	Biofilm formation and <i>ICEBsI</i> conjugation activation are simultaneous.....	31

Figure 2.4.	Matrix production is important for conjugation.....	33
Figure 2.5.	Both matrix components are important for <i>ICEBsI</i> conjugation.....	36
Figure S1.	LBGM and MSgg induce biofilm formation.....	53
Figure S2.	<i>nicK</i> residual exconjugant formation is due to natural transformation.....	53
Figure S3.	<i>ICEBsI</i> ⁰ <i>attB</i> -down recipient cell can acquire <i>ICEBsI</i> , while its <i>attB</i> site cannot be amplified.....	54
Figure S4.	Biofilm does not affect <i>ICEBsI</i> excision over time.....	55
Figure S5.	Conjugative transfer of <i>ICEBsI</i> is inefficient in shaking conditions.....	55
Figure S6.	Polymers can act as a surrogate biofilm in absence of extracellular matrix.....	56

CHAPITRE 3 : L'INFILTRATION DU BIOFILM PAR *ICEBsI*

Figure 3.1.	Schéma illustrant l'expérience d'infiltration de biofilm déjà établi par <i>ICEBsI</i>	61
-------------	---	----

Figure 3.2.	ICEBsI est capable d'infiltrer un biofilm déjà établi, même dans la partie distale du biofilm des réceptrices.....	62
Figure 3.3.	La formation de biofilm de la réceptrice influence l'infiltration d'ICEBsI.....	64
Figure 3.4.	Une diminution de donneuses, mais pas leur motilité, influence l'infiltration d'ICEBsI.....	65

CHAPITRE 1

INTRODUCTION GÉNÉRALE

1.1 Le transfert horizontal de gènes

La résistance aux antibiotiques des bactéries est un problème pour le milieu clinique et agricole générant de plus en plus d'inquiétude à l'échelle mondiale. En effet, dû à un usage abusif des antibiotiques dans ces milieux, on retrouve de plus en plus de bactéries multirésistantes aux antibiotiques dans l'environnement et celles-ci causent un nombre croissant d'infections (Levy and Bonnie, 2004). Ce problème est aussi exacerbé par le manque de découvertes et de développement de nouvelles classes d'antibiotiques au cours des trois dernières décennies (Silver, 2011). La résistance à un antibiotique peut être acquise de différentes manières. Par exemple, le génome d'une bactérie peut subir une mutation ponctuelle qui va causer une substitution non synonyme, ce qui entraînerait un changement au niveau de la protéine cible d'un antibiotique donné, le rendant ainsi moins efficace (Leclercq, 2002). D'autres exemples de moyens de résistances retrouvés chez les bactéries résistantes sont la présence de gènes codant pour des pompes à efflux, qui peuvent exporter les antibiotiques en dehors de la cellule, ou encore pour des enzymes capables d'inactiver les antibiotiques (Wilson, 2014; Wright, 2005). Cependant, la dissémination massive de ces gènes responsables de la résistance aux antibiotiques est causée par le transfert horizontal de gène (HGT) (Ochman et al., 2000). Le HGT consiste au transfert de matériel génétique entre deux microorganismes. Il existe trois types de HGT : la transformation, la transduction et la conjugaison (Johnson and Grossman, 2015). La transformation est l'acquisition active d'ADN exogène par des bactéries dites compétentes, pour ensuite être intégré dans leur génome (Krüger and Stingl, 2011). La transduction, quant à elle, est le transfert d'ADN d'une bactérie à une autre médié par un bactériophage.

Les bactériophages, lors de la phase lytique, peuvent parfois encapsider des fragments de génome de leur hôte en plus de leur ADN viral, permettant ainsi ce transfert d'ADN bactérien lorsque le bactériophage infectera une nouvelle bactérie (Colavecchio et al., 2017). Le troisième mécanisme de HGT est la conjugaison. Comme ce projet de recherche se concentre sur la conjugaison, nous allons détailler ce phénomène plus en profondeur.

1.1.1 La conjugaison

La conjugaison a été observée pour la première fois il y a de cela plus de sept décennies (Tatum and Lederberg, 1947). Elle consiste en un transfert d'ADN unidirectionnel entre bactéries et nécessite un contact cellule-cellule (Johnson and Grossman, 2015). Elle permet le transfert d'éléments génétiques mobiles (MGEs), qui sont retrouvés chez pratiquement tous les clades de procaryotes (Guglielmini et al., 2011). Ces MGEs ont souvent la particularité de porter des gènes impliqués dans une panoplie de processus bactériens tels que des gènes de résistance aux antibiotiques et métaux lourds, des facteurs de virulence ou des gènes de symbiose, pour ne nommer que ceux-ci (Finan, 2002; Haaber et al., 2017; He et al., 2004; Hemme et al., 2016). La conjugaison a donc joué un rôle important dans l'évolution et l'adaptation bactérienne. Elle nécessite aussi la formation d'un pore de conjugaison, qui est en fait un système de sécrétion de type IV (T4SS) (Alvarez-Martinez and Christie, 2009). Il existe différents types de MGE, comme les plasmides conjugatifs, les éléments intégratifs et conjugatifs (ICEs) ou les îlots génomiques mobilisables.

1.1.1.1 Élément intégratif et conjugatif (ICE)

Au début des années 80, une étude a démontré que des cellules de *Enterococcus faecalis* résistantes à la tétracycline pouvaient transférer leur résistance par conjugaison, et ce, sans

l'apport de plasmides conjugatifs (Franke and Clewell, 1981). Ces expériences ont été les premières à mettre en évidence l'existence des ICEs, auparavant nommés transposons conjugatifs. Ce sont des éléments qui sont retrouvés intégrés dans le génome de leur hôte tout en codant pour leur propre T4SS (Johnson and Grossman, 2015). Ils n'ont donc pas besoin de la présence d'un autre MGE en *trans* afin de se transférer. Le cycle de vie normal d'un ICE est illustré à la Figure 1.1 et débute en étant intégré dans le génome de sa bactérie hôte, flanqué des sites *attL* et *attR*. Un stimulus va ensuite induire l'excision de l'ICE, ainsi que l'expression des gènes codant pour les protéines formant le T4SS (Delavat et al., 2017). Ces stimuli sont variés et sont différents d'un élément à un autre. Ils peuvent être, par exemple, des dommages à l'ADN, la communication cellule-cellule (*quorum sensing*), l'entrée en phase stationnaire ou la présence d'un antibiotique pour lequel l'ICE offre une résistance (Auchtung et al., 2005; Miyazaki et al., 2012; Ramsay et al., 2009; Scornec et al., 2017). Une fois excisé du génome hôte, l'ICE va se circulariser et le relaxosome, un complexe formé de la relaxase encodée par l'ICE et de cofacteurs nécessaires au fonctionnement de la relaxase, va cliver cette forme plasmidique de l'ICE à son *oriT* (Llosa et al., 2002). Le relaxosome va ensuite se lier à l'extrémité 5' de l'ADN de transfert (ADN-T) simple-brin clivé de l'ICE pour le conduire vers le T4SS (Llosa et al., 2002). Après liaison entre le relaxosome et la protéine de couplage du T4SS, l'ADN-T va être transmis à la cellule réceptrice par le T4SS (Carraro and Burrus, 2014). L'ADN-T va se recirculariser, son brin complémentaire est synthétisé et il va y avoir intégration dans le génome de la réceptrice (Wright and Grossman, 2016). Il va aussi y avoir synthèse du brin complémentaire de l'ICE dans la donneuse, afin qu'il puisse réintégrer le génome hôte (Johnson and Grossman, 2015). Ainsi, la réceptrice deviendra un transconjugant et pourra transmettre l'ICE à son tour à de nouvelles cellules réceptrices.

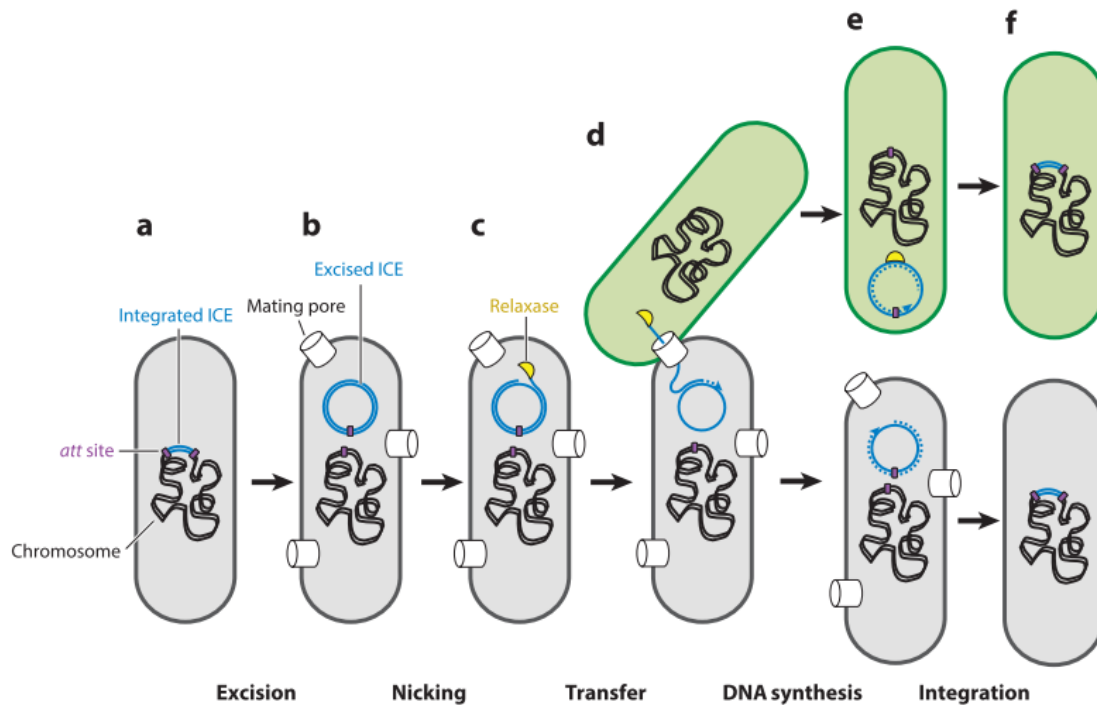


Figure 1.1 : Cycle de vie normal d'un ICE (Tirée de Johnson et Grossman, 2015).

1.1.2 Les différences dans la conjugaison des bactéries à Gram positif et négatif

Il existe quelques différences entre la conjugaison chez les bactéries à Gram positif et celle à Gram négatif. La première différence se situe au niveau du T4SS (Figure 1.2). En effet, comme la paroi de peptidoglycane et la membrane cellulaire sont arrangées différemment entre les bactéries à Gram positif et négatif, leur T4SS est structuré de manière différente. Chez les bactéries à Gram négatif, le T4SS a été étudié rigoureusement. Il existe trois sous-familles de T4SS, mais la plus connue, celle apparentée au T4SS d'*Agrobacterium tumefaciens*, est composée de 12 sous-unités, soit VirB1-B11 et VirD4 (Christie, 1997, 2016). Les protéines VirB1-B11 sont responsables de la formation du pore de conjugaison, tandis que VirD4 est la protéine de couplage. Les protéines structurales du pore de conjugaison vont avoir plusieurs rôles, tels que de s'ancrer dans la membrane interne

(VirB3, VirB6, VirB8), former le pilus conjugatif (VirB1, VirB2, VirB5) et de former le complexe de la membrane externe (VirB7, VirB9, VirB10) (Grohmann et al., 2018). L'énergie nécessaire à la translocation de l'ADN est fournie par les ATPases cytoplasmiques (VirB4, VirB11, VirD4) (Grohmann et al., 2018). En contrepartie, le T4SS chez les bactéries à Gram positif est beaucoup plus simple. Plusieurs de ces T4SS consistent en une version réduite de celui des bactéries à Gram négatif. En effet, il y a souvent l'absence des protéines responsables de la formation du complexe de la membrane externe, des protéines responsables de la formation du pilus et d'une des ATPase cytoplasmique (Bhatty et al., 2013). Cependant, le T4SS chez les bactéries à Gram positif a été beaucoup moins étudié que son équivalent chez les bactéries à Gram négatif, donc plusieurs points d'interrogation persistent encore quant à sa structure et à son fonctionnement.

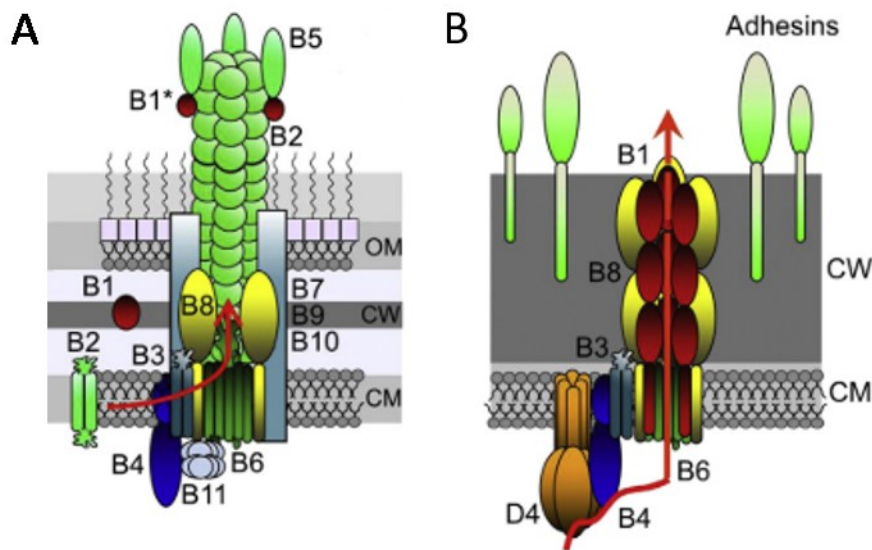


Figure 1.2 : Structure typique du T4SS chez les bactéries à Gram négatif (A) et positif (B) (Tirée de Bhatty et al., 2013).

Les facteurs aidant à stabiliser le contact cellule-cellule lors du transfert sont un autre aspect différenciant les T4SS des bactéries à Gram positif et négatif. Comme mentionné plus haut, les MGEs des bactéries à Gram négatif produisent un pilus conjugatif. Ce pilus est capable de se contracter et de se rétracter, de sorte à favoriser le contact entre les donneuses et les réceptrices (Thanassi et al., 2012). Plusieurs types de pili sont retrouvés chez les T4SS des bactéries à Gram négatif, comme les pili de type F ou les pili de type P. Ces types de pili diffèrent surtout par leur dimension, leur rigidité et leur capacité à se contracter et se rétracter (Christie, 2016). Cependant, les MGEs des bactéries à Gram positif n'encodent pas ce type de structure. Ils codent plutôt pour des adhésines de surface, qui sont en fait des facteurs d'agrégation (Hirt et al., 2005). De plus, certains éléments ne codent pour aucune adhésine, rendant ainsi leur transfert en milieu liquide moins efficace (Alvarez-Martinez and Christie, 2009).

1.1.3 Le transfert horizontal de gène en biofilm

Tout d'abord, le biofilm est une communauté bactérienne entourée d'une matrice extracellulaire qui apporte plusieurs bénéfices aux bactéries dans le biofilm. Celles-ci ont une protection accrue face à différents facteurs tels que les antibiotiques, les métaux lourds et les UV ou bien un accès facilité à des nutriments (Hall-Stoodley et al., 2004). Le biofilm est aussi le mode de vie bactérien le plus fréquent, que ce soit dans l'environnement ou en milieu clinique (Costerton J et al., 1995). Les biofilms sont aussi des communautés complexes et multi-différenciées. Par exemple, chez *Bacillus subtilis*, on peut retrouver des bactéries motiles, des bactéries sous forme de spores ou encore des bactéries compétentes, en plus des bactéries responsables de la production de la matrice extracellulaire (Lopez et al., 2009a). La composition des biofilms varie d'une espèce à une autre, et même d'une souche à une autre, mais ils sont généralement composés de polysaccharides, de protéines, de lipides et d'ADN exogène (Branda et al., 2005; Costerton J et al., 1995; McCarthy et al., 2015).

Il est souvent reconnu que le biofilm est un environnement propice pour le HGT. En effet, un haut taux de transfert de plasmides conjugatifs a été observé à de multiples occasions en conditions de biofilm (Aminov, 2011; Hausner and Wuertz, 1998; Tanner et al., 2017). Il y a même certains plasmides conjugatifs qui codent pour des protéines de surface jouant un rôle dans la formation de biofilm (Bhatty et al., 2015; Burmølle et al., 2008). Des événements de transformation et de transduction en biofilm ont d'ailleurs aussi déjà été observés (Madsen et al., 2012; Solheim et al., 2013). Ce haut taux de transfert est souvent attribué à un contact cellule-cellule amélioré par la présence du biofilm. Plusieurs autres études se sont penchées sur la capacité d'un MGE à infiltrer un biofilm et de s'y propager. Ces études ont démontré que le transfert était particulièrement efficace à l'interface entre les deux colonies, mais que le transfert ne se propageait pas au-delà de cette zone d'interface (Christensen et al., 1996; Reisner et al., 2012; Seoane et al., 2011). Une raison pouvant expliquer ce transfert limité est que les cellules métaboliquement actives se trouvent dans la partie externe du biofilm, et non l'intérieur de celui-ci, ce qui limiterait le transfert à ces cellules actives (Haagensen et al., 2002). Une autre raison pourrait être le manque de nutriments retrouvé au centre du biofilm, ce qui limiterait le transfert au-delà de l'interface entre les donneuses et les réceptrices (Fox et al., 2008). Comme la conjugaison est un processus énergétiquement coûteux, elle pourrait être inhibée si les cellules donneuses sont en condition de manque nutritif.

1.2 *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis est une bactérie à Gram positif modèle chez les bactéries à Gram positif, car les génomes de plusieurs souches ont été entièrement séquencés et qu'elle est facile à modifier génétiquement, comparativement à plusieurs autres bactéries à Gram positif. *B. subtilis* est une rhizobactérie promotrice de croissance de plante, c'est-à-dire une bactérie retrouvée dans la rhizosphère des plantes et qui va apporter des bénéfices aux plantes qu'elle colonise. Les bénéfices apportés par *B. subtilis* sont variés : elle peut stimuler la

croissance par la sécrétion d'hormones de plantes, aider à la défense de la plante contre les phytopathogènes ou aider la plante à mieux résister à différents stress (Jung et al., 2014; Lastochkina et al., 2017; Tahir et al., 2017). Plusieurs processus biologiques de *B. subtilis* ont été étudiés rigoureusement au fil du temps, tels que la sporulation, la chimiotaxie ou la colonisation des racines de plante (Allard-Massicotte et al., 2016; Beauregard et al., 2013; Tan and Ramamurthi, 2014). Un autre aspect de *B. subtilis* qui a aussi été étudié méticuleusement est sa capacité à former du biofilm.

1.2.1 Le biofilm de *B. subtilis*

Le biofilm de *B. subtilis* est étudié depuis maintenant presque deux décennies et sa composition ainsi que les mécanismes dictant sa régulation ont été explorés exhaustivement. Tout d'abord, *B. subtilis* est capable de former du biofilm sur des surfaces solides, mais aussi à l'interface air-liquide (Branda et al., 2001). Le biofilm de *B. subtilis* est constitué d'exopolysaccharides, de fibres amyloïdes et d'ADN extracellulaire (Branda et al., 2005). Les gènes impliqués dans la production des exopolysaccharides sont situés dans l'opéron *epsA-O*. Les gènes *epsHIJK* de cet opéron sont responsables de la production de poly-*N*-acetylglucosamine, et ce sucre serait une composante majeure des exopolysaccharides (Roux et al., 2015). Les autres gènes de cet opéron sont aussi responsables de la synthèse de polysaccharides, mais comme ils ont été très peu étudiés, les polysaccharides produits par ceux-ci sont encore inconnus. Les fibres amyloïdes quant à elles sont produites à partir du gène *tasA* (Branda et al., 2004, 2006). Le gène *tasA* est retrouvé en opéron avec les gènes *tapA* et *sipW*, et ceux-ci sont importants dans la sécrétion des fibres amyloïdes. En effet, TapA permet l'ancrage de TasA à la paroi cellulaire et est une composante mineure des fibres amyloïdes, tandis que SipW est une peptidase de signal responsable de cliver les protéines TapA et TasA, afin qu'elles puissent être relâchées de la membrane et ainsi aller rejoindre la paroi (Romero et al., 2011; Stöver and Driks, 1999). TasA offre une intégrité structurale aux biofilms de deux manières : elle permet de lier les

cellules ensemble et elle sert d'échafaud sur lequel les exopolysaccharides peuvent s'établir (Romero et al., 2010). De plus, les exopolysaccharides et les fibres amyloïdes sont considérés comme des biens publics, et peuvent ainsi être partagés avec des bactéries qui ne produisent pas ces composantes (Branda et al., 2006). Ils sont aussi capables de se compléter, c'est-à-dire que si une bactérie produit les exopolysaccharides et une autre produit les fibres amyloïdes, les bactéries peuvent former un biofilm complet semblable à celui d'une souche WT (Branda et al., 2006). Une autre protéine impliquée dans la formation de biofilm est l'hydrophobine BslA, qui va donner au biofilm de *B. subtilis* son caractère hydrophobe (Kobayashi and Iwano, 2012).

La formation de biofilm chez *B. subtilis* est un phénomène de différenciation cellulaire hautement régulé (Figure 1.3). La régulation de la formation du biofilm commence par l'activation du régulateur transcriptionnel Spo0A. Son activation passe par son niveau de phosphorylation. Ce dernier est contrôlé par quatre différentes kinases (KinA-D) qui phosphorylent directement Spo0A ou indirectement à l'aide d'un phosphorelais (Jiang et al., 2000). Ce phosphorelais consiste premièrement en la phosphorylation de Spo0F par les différentes kinases. Spo0F~P transfère ensuite son phosphate à Spo0B, qui à son tour va transférer son phosphate à Spo0A. Parmi les kinases pouvant affecter le niveau de phosphorylation de Spo0A, KinC et KinD sont celles qui sont le plus impliquées dans la régulation de la formation de biofilm (Grau et al., 2015). Différents signaux peuvent activer la phosphorylation de KinC et KinD, et donc initier la cascade de signalisation menant à la formation de biofilm. Parmi ceux-ci, on retrouve la surfactine et la nystatine, qui agissent en induisant une fuite de potassium, un mélange de manganèse et de glycérol, l'acide malique ou encore des polysaccharides de racines de plante comme la pectine et le xylane (Beauregard et al., 2013; Chen et al., 2012; Lopez et al., 2009b; Shemesh and Chai, 2013).

Lorsque le niveau de Spo0A~P dans la cellule est intermédiaire, il y aura activation de l'expression des gènes impliqués dans la formation de biofilm (Vlamakis et al., 2013). Une

fois ce niveau adéquat de Spo0A~P atteint, il y a inhibition des deux protéines impliquées dans l'inhibition des opérons *epsA-O* et *tapA-sipW-tasA*, qui sont responsables de la production de la matrice extracellulaire. La première de ces protéines est le régulateur de transition de phase de croissance, AbrB. Spo0A~P peut inhiber directement sa transcription, ou indirectement par l'activation de l'expression du gène *abbA*, qui code pour un inhibiteur de AbrB (Banse et al., 2008; Strauch et al., 1990). La deuxième protéine est SinR et, comme pour AbrB, Spo0A~P va activer la transcription de son inhibiteur, *sinI* (Fujita et al., 2005). Un autre niveau de régulation de SinR passe par la protéine SlrA, qui va inhiber SinR lorsque la transcription du gène *slrA* est activée suite à la répression de son régulateur de transcription YwcC (Chai et al., 2009). Pour ajouter un autre niveau de complexité à la régulation de la formation de biofilm, SlrR est une autre protéine capable d'inhiber l'activité de SinR. L'expression de *slrR* est normalement inhibée par SinR, mais lorsque celle-ci est inhibée par SinI et SlrA, *slrR* peut être exprimé et la protéine produite va inhiber SinR, créant ainsi une boucle de régulation négative sur SinR (Chai et al., 2010a). Ce complexe SlrR-SinR joue aussi un rôle dans l'inhibition de l'expression des gènes codant pour les protéines nécessaires à la motilité, puisque les cellules produisant la matrice extracellulaire sont non-motiles (Chai et al., 2010a). Il est aussi responsable de l'inhibition de l'expression des gènes *lyt*, qui codent pour les autolysines responsables de la séparation des cellules à la suite de la division cellulaire, ce qui va permettre l'assemblage des bactéries en chaînes (Chai et al., 2010b).

Ainsi, l'inhibition de SlrR sur SinR sera levée et SinR pourra de nouveau inhiber l'expression des opérons *epsA-O* et *tapA-sipW-tasA*. Cette dispersion va donc permettre aux cellules de *B. subtilis* de coloniser de nouveaux environnements plus propices à la croissance planctonique et à la formation d'un nouveau biofilm.

1.2.2 ICEBsI

Bacillus subtilis est l'hôte de ICEBsI, un ICE d'environ 20,5 kb inséré à l'extrémité 3' du gène *trnS-leu2*, qui code pour un ARN de transfert pour la leucine (Figure 1.4) (Burrus et al., 2002). Les gènes portés sur ICEBsI sont homologues à ceux de plusieurs autres ICEs de bactéries à Gram positif, tels qu'ICEStI de *Streptococcus thermophilus* ou ICE6013 de *Staphylococcus aureus* (Burrus et al., 2002; Smyth and Robinson, 2009). Cependant, contrairement à ces autres éléments, les avantages qu'ICEBsI pourraient apporter à sa cellule hôte ne sont pas encore connus. En fait, jusqu'à présent, le seul rôle connu d'ICEBsI est sa capacité à mobiliser des plasmides normalement non mobilisables (Lee et al., 2012). Malgré cela, ICEBsI est tout de même conservé chez la majorité des souches de *B. subtilis* (Earl et al., 2007). ICEBsI est aussi capable d'être transféré chez d'autres espèces de *Bacillus*, ainsi que chez différents genres bactériens, tels que *B. anthracis*, *B. licheniformis* et *Listeria monocytogenes* (Auchtung et al., 2005).

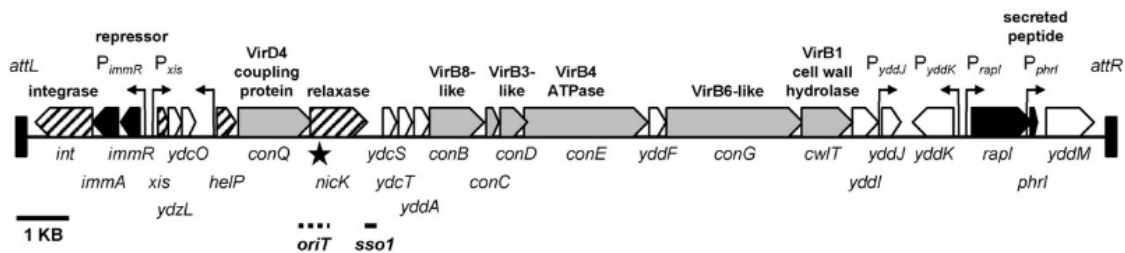


Figure 1.4. Arrangement génétique d'ICEBsI. L'étoile représente le site de clivage de NicK. (Adaptée de Auchtung et al., 2016)

Le transfert d'*ICEBsI* est finement régulé (Figure 1.5). Tout d'abord, en condition ne favorisant pas l'excision et le transfert d'*ICEBsI*, l'expression des gènes impliqués dans ces deux processus est inhibée par la protéine ImmR (Auchtung et al., 2007). Cette protéine a aussi un rôle à jouer dans l'immunité face à l'acquisition d'une deuxième copie d'*ICEBsI* (Auchtung et al., 2007). L'inhibition de l'excision et du transfert d'*ICEBsI* par ImmR peut être levée par deux voies de signalisation : soit par la protéine RapI ou par la protéine RecA (Auchtung et al., 2005). L'expression de *rapI* est normalement inhibée par la protéine AbrB lorsque la concentration cellulaire est insuffisante (Auchtung et al., 2016). Cependant, lorsque la population atteint une densité cellulaire suffisamment élevée, RapI sera exprimée et pourra activer l'anti-répresseur protéolytique ImmA (Auchtung et al., 2005; Bose et al., 2008). ImmA va ensuite cliver ImmR, ce qui aura pour effet de lever l'inhibition sur l'expression des gènes impliqués dans l'excision et le transfert. RecA, quant à elle, est activée lorsqu'il y a des dommages à l'ADN, et inhibe aussi ImmR par le même processus que RapI, soit via la protéine ImmA (Auchtung et al., 2005; Bose et al., 2008). RapI et RecA semblent augmenter l'activité de ImmA, mais le mécanisme impliqué dans cette activation reste jusqu'à présent encore incertain (Bose and Grossman, 2011). Une autre couche de la régulation de l'excision et du transfert d'*ICEBsI* passe par la protéine PhrI. PhrI est la protéine inhibitrice de RapI et se retrouve en opéron sur *ICEBsI* (Pottahil and Lazazzera, 2003). PhrI est produite sous forme de propeptide, qui est sécrété dans le milieu extracellulaire et maturé par des peptidases (Pottahil and Lazazzera, 2003). PhrI est ensuite réinternalisée dans les cellules par la perméase Opp, permettant ainsi à PhrI de lier RapI et de l'inhiber (Auchtung et al., 2005). Puisque *phrI* est aussi exprimé par son propre promoteur, la concentration de PhrI corrèle avec la quantité de cellules portant *ICEBsI* dans la population (Figure 1.5). Ainsi le transfert d'*ICEBsI* va être inhibé lorsqu'il y a une quantité suffisante de cellules portant *ICEBsI*. D'autres facteurs pouvant influencer le transfert d'*ICEBsI* sont la composition de la membrane de la réceptrice et la composition ionique de l'environnement extracellulaire (Johnson and Grossman, 2016).

ICEBsI et SsbB, une protéine se liant à l'ADN simple-brin (Lee et al., 2010; Thomas et al., 2013). L'origine de réplication *ssol* est située entre les gènes *nicK* et *ydcS*, mais il semblerait qu'il y ait une autre région à partir de laquelle la réplication serait possible (Wright et al., 2015). Cette région n'est pas encore aussi bien caractérisée, mais elle est située quelque part entre les gènes *conB* et *conG* (Wright et al., 2015). Il va aussi y avoir expression de tous les gènes impliqués dans la formation du T4SS, soit *conBCDEGQ* et *cwlT* (Berkmen et al., 2010; DeWitt and Grossman, 2014; Leonetti et al., 2015). Une fois transféré dans la réceptrice, *ICEBsI* pourra être intégré au site *attB*, situé à l'extrémité 3' du gène *trnS-leu2*. Cette intégration dans le génome est dépendante de la protéine *int* (Lee et al., 2007). Si jamais *attB* est délété ou muté, il existe des sites de recombinaison secondaires dont la séquence diffère légèrement de celle de *attB* (Menard and Grossman, 2013). Cependant, l'insertion d'*ICEBsI* à un de ces sites secondaires altère négativement toutes excisions subséquentes, ce qui limiterait la propagation d'*ICEBsI* (Menard and Grossman, 2013).

Dans une population où l'excision d'*ICEBsI* n'est pas induite, *ICEBsI* sera excisé chez environ 0,005 % des cellules (Lee et al., 2007). Lorsque son excision est induite, que ce soit en surexprimant le gène *rapI* ou en ajoutant de la mitomycine C pour provoquer des dommages à l'ADN, *ICEBsI* est excisé chez environ 90 % et 20 % des cellules, respectivement (Lee et al., 2007). Le taux de formation de transconjugants obtenu lorsque l'excision d'*ICEBsI* est induite est d'environ 1 % (Auchtung et al., 2005). *ICEBsI* est aussi capable d'être transféré efficacement à travers des chaînes de bactéries, dans lesquelles il ne suffit que d'un événement de conjugaison pour qu'*ICEBsI* soit transféré à travers toute la chaîne (Babic et al., 2011).

1.3 Hypothèse de recherche et objectifs

Comme mentionné plus haut, plusieurs études ont été effectuées sur la caractérisation de la régulation et de la mécanistique du transfert d'*ICEBsI*. Ces études utilisent la souche *B. subtilis* JH642, une souche domestiquée qui a perdu la capacité de former un biofilm robuste. Effectivement, chez *B. subtilis*, plusieurs souches ont perdu cette fonction à la suite de leur domestication en laboratoire et l'accumulation de mutations chez des gènes impliqués dans la régulation de la formation de biofilm (McLoon et al., 2011). Ainsi, l'impact de la formation de biofilm sur le transfert d'*ICEBsI* n'a jamais été étudié. En fait, même s'il est souvent mentionné que le biofilm est un environnement propice pour le transfert de plasmide conjugatif, cela n'a jamais été démontré pour les ICEs. De plus, l'impact du biofilm sur le transfert conjugatif n'a jamais été quantifié, puisque le transfert en biofilm n'a jamais été comparé à un transfert sans biofilm. Un autre aspect du transfert en biofilm qui est souvent pris pour acquis est que le biofilm serait bénéfique pour la conjugaison en apportant un meilleur contact cellule-cellule, ce qui stabiliserait le contact entre une cellule donneuse et réceptrice. Cependant, ce paradigme n'a jamais été démontré expérimentalement et les mécanismes pouvant amener un meilleur transfert conjugatif en biofilm restent encore à être élucidés. Finalement, nous nous sommes intéressés à l'infiltration de biofilm par *ICEBsI*. Effectivement, bien que plusieurs études démontrent que l'infiltration de biofilm par des MGEs était limitée, plusieurs d'entre elles observaient ce phénomène chez des colonies attachées sur agar, en absence de biofilm. Il semble donc y avoir une certaine confusion dans la littérature entre une colonie attachée à une surface et un biofilm, puisque certaines études citent ces articles étudiant les colonies attachées aux surfaces pour discuter du transfert de MGE en biofilm.

C'est ainsi dans ce contexte que s'installe l'objectif général de ma maîtrise, qui est de caractériser le transfert d'*ICEBsI* en fonction de la formation de biofilm. Notre hypothèse

générale est que la formation de biofilm améliore le transfert d'*ICEBsI*. Pour répondre à cet objectif, nous avons fixé trois sous-objectifs. Le premier sous-objectif était d'établir la dynamique du transfert d'*ICEBsI* lors de la formation de biofilm. Le deuxième sous-objectif était d'expliquer l'effet du biofilm sur le transfert d'*ICEBsI*. Finalement, le troisième objectif était d'examiner l'infiltration d'*ICEBsI* dans un biofilm déjà établi et d'observer les facteurs pouvant influencer cette infiltration. Les deux premiers sous-objectifs ont été réunis ensemble dans le cadre d'un article, qui a été accepté et publié à l'été 2018 dans la revue mSphere, et seront donc également ensemble dans le cadre de ce mémoire.

CHAPITRE 2

ARTICLE SCIENTIFIQUE

2.1 Introduction de la publication

2.1.1 Résumé de l'article

Le transfert horizontal de gènes est la principale cause de la dissémination massive des résistances aux antibiotiques à laquelle nous faisons face présentement. Le biofilm est le mode de vie prépondérant des bactéries, que ce soit dans l'environnement ou en milieu clinique. Il est connu que le biofilm est un environnement propice pour le transfert de plasmides conjugatifs. Cependant, il existe peu d'information sur le transfert d'ICE en biofilm. En fait, l'impact du biofilm et la manière dont il affecte le transfert n'ont jamais été étudiés. Nous avons donc étudié le microorganisme modèle *B. subtilis*, qui a la capacité de former un biofilm robuste et qui est l'hôte d'un ICE nommé ICEBs1. En utilisant différents milieux de culture qui induisent ou non la formation de biofilm, nous avons observé que la présence de biofilm augmentait de 100 à 10 000 fois le transfert conjugatif. Nous avons aussi montré que cette hausse du transfert conjugatif n'est pas due à un taux d'excision plus élevé, mais plutôt à un meilleur contact cellule-cellule médié par la production de matrice extracellulaire. Nous avons également observé que la production de matrice de la part des réceptrices était importante pour un transfert optimal. D'ailleurs, nous avons observé que la présence des deux composantes majeures du biofilm, les fibres amyloïdes et les exopolysaccharides, était essentielle pour un transfert optimal.

2.1.2 Originalité du travail

Cet article est le premier à montrer de manière quantitative l'avantage que la formation de biofilm apporte pour la conjugaison. C'est aussi la première fois que le transfert d'un ICE en biofilm a été observé. C'est également le premier article à étudier le transfert d'*ICEBsI* sans avoir à induire artificiellement son transfert. Nous avons observé que la formation de biofilm pouvait amener un niveau de conjugaison aussi élevé que lorsque le transfert d'*ICEBsI* est induit. Le niveau de conjugaison observé est d'ailleurs un des plus élevés pour un MGE d'une bactérie à Gram positif, considérant l'absence d'induction artificielle. Nous avons aussi montré expérimentalement la manière par lequel le biofilm augmente le transfert conjugal. Ces travaux mettent en lumière l'importance du biofilm pour le transfert conjugal dans l'environnement, particulièrement chez les bactéries à Gram positif. Effectivement, le transfert de nombreux éléments conjuguatifs des bactéries à Gram positif est souvent faible, mais leur transfert est rarement observé dans des conditions permettant la formation de biofilm. Donc, peut-être que si ces éléments étaient observés dans de telles conditions, il pourrait s'avérer que leur taux de transfert est moins faible que ce que la littérature laisse présager présentement.

2.1.3 Contribution des auteurs

Voici la contribution des auteurs de l'article :

Frédéric Lécuyer, étudiant 2^e cycle : J'ai participé à la production de la majorité des résultats, de leurs analyses, ainsi qu'à l'écriture du manuscrit et à l'élaboration du projet qui a mené à cet article.

Jean-Sébastien Bourassa, étudiant 2^e cycle : Sous ma supervision lors d'un stage, Jean-Sébastien a construit les souches utilisées pour les expériences de qPCR, pour ensuite les effectuer et analyser les résultats. Il a aussi contribué à réviser le manuscrit avant la soumission.

Martin Gélinas, étudiant 2^e cycle : Martin a effectué les essais préliminaires qui ont servi de base à l'élaboration du projet qui a mené à cet article. Il a aussi contribué par la construction de quelques souches et par la révision du manuscrit avant la soumission.

Vincent Charron-Lamoureux, étudiant 3^e cycle : Vincent a construit une souche ayant une cassette de résistance intergénique, que j'ai par la suite utilisée dans plusieurs de mes souches. Il a aussi contribué à réviser le manuscrit avant la soumission.

Pr. Vincent Burrus : Vincent a contribué à l'élaboration du projet qui a mené à cet article, ainsi qu'à l'écriture du manuscrit.

Pre. Pascale B. Beauregard : Pascale a été la principale investigatrice du projet et a donc contribué à l'élaboration du projet qui a mené à cet article, ainsi qu'à l'écriture du manuscrit.

2.1.4 Référence de l'article

Lécuyer F, Bourassa J-S, Gélinas M, Charron-Lamoureux V, Burrus V, Beauregard PB. 2018. Biofilm formation drives transfer of the conjugative element *ICEBsI* in *Bacillus subtilis*. mSphere 3:e00473-18.

2.2 Manuscrit de l'article scientifique

Biofilm formation drives transfer of the conjugative element ICEBs1 in *Bacillus subtilis*

Frédéric Lécuyer¹, Jean-Sébastien Bourassa¹, Martin Gélinas¹, Vincent Charron-Lamoureux¹, Vincent Burrus¹ and Pascale B. Beauregard^{1#}

¹ Département de biologie, Faculté des sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada

Running title: ***Bacillus subtilis* biofilm enhances conjugation**

2.2.1 Abstract

Horizontal gene transfer by integrative and conjugative elements (ICE) is a very important mechanism for spreading antibiotic resistance in various bacterial species. In environmental and clinical settings, most bacteria form biofilms as a way to protect themselves against extracellular stress. However, much remains to be known about ICE transfer in biofilms. Using *ICEBsI* from *B. subtilis*, we show that natural conjugation efficiency of this ICE is greatly affected by the ability of donor and recipient to form a biofilm. *ICEBsI* transfer considerably increases in biofilm, even at low donor:recipient ratios. Also, while there is a clear temporal correlation between biofilm formation and *ICEBsI* transfer, biofilms do not alter the level of *ICEBsI* excision in donor cells. Conjugative transfer appears to be favoured by the biophysical context of biofilms. Indeed, extracellular matrix production, particularly from the recipient cells, is essential for biofilms to promote *ICEBsI* transfer. Our study provides basic new knowledge on the high rate of conjugative transfer of ICEs in biofilms, a widely preponderant bacterial lifestyle in the environment, which could have a major impact on our understanding of horizontal gene transfer in natural and clinical environments.

2.2.2 Importance

Transfer of mobile genetic elements from one bacterium to another is the principal cause of the spread of antibiotic resistance. However, the dissemination of these elements in environmental contexts is poorly understood. In clinical and environmental settings, bacteria are often found living in multicellular communities encased in a matrix, a structure known as a biofilm. In this study, we examined how forming a biofilm influences the transmission of an integrative and conjugative element (ICE). Using the model Gram-positive bacterium *B. subtilis*, we observed that biofilm formation highly favours ICE transfer. This increase in conjugative transfer is due to the production of extracellular matrix, which creates an ideal biophysical context. Our study provides important insights on the role of the biofilm structure in driving conjugative transfer, which is of major importance since biofilm is a widely preponderant bacterial lifestyle for clinically relevant bacterial strains.

2.2.3 Introduction

Acquisition of genetic material via horizontal gene transfer (HGT) is a fundamental phenomenon for bacterial adaptation and evolution (1). Conjugation, which is regarded as the broadest and most efficient mechanism of HGT, allows bacteria to transfer genetic material such as conjugative plasmids and integrative and conjugative elements (ICEs) through direct cellular contact (2). These mobile genetic elements are autonomous since they encode for their own mating apparatus. They often contain genes responsible for a wide range of functions including virulence, antibiotic resistance and symbiosis (3-5). Conjugative plasmids and ICEs can often transfer between different bacterial species and genera, and mobilize genomic islands or plasmids that are otherwise not self-transmissible, granting these elements an extensive role in bacterial evolution (6-9).

ICEBsI is a 20.5 kb ICE that is present in many strains of *Bacillus subtilis* (10, 11), a low-G+C Gram-positive bacterium that is well studied for its plant-growth-promoting effect (12-14). While *ICEBsI* can mobilize genetic elements lacking mobilization functions (8), whether it provides any advantage for its host cell remains unclear (15). *ICEBsI* transmission is initiated in the donor cell by its excision from the 3' end of the chromosomal *trnS-leu2* gene (10). The resulting double-stranded circular intermediate undergoes rolling-circle replication initiated at the origin of transfer (*oriT*) by the relaxase *NicK* that cleaves the DNA strand to be transferred (16, 17). The nicked strand of *ICEBsI* is then translocated into the recipient cells by an *ICEBsI*-encoded type IV secretion system (17, 18). In the recipient cell, the transferred strand is recircularized and its complementary strand is synthesized. The circular copy of *ICEBsI* then integrates at the 3' end of *trnS-leu2*, the *attB* site of the chromosome of the recipient (19).

Interestingly, two distinct cellular pathways regulate *ICEBsI* excision. One is the global DNA damage response, which is mediated via the DNA repair protein RecA that acts as an activator of conjugation. The other pathway is the *ICEBsI*-encoded quorum sensing system RapI-PhrI, consisting in RapI, an inducer of *ICEBsI* excision that can be inhibited by the co-expressed oligopeptide PhrI (10), which is secreted in the extracellular environment and imported back in the cell through a permease. In this pathway, *ICEBsI* excision is repressed in a community where *ICEBsI*-harboring cells are widely present since extracellular PhrI level is sufficient to inhibit RapI (10).

Biofilms are bacterial communities surrounded by an extracellular matrix that protects the bacteria from external stressors such as antibiotics and heavy metals (20, 21). In the environment and during chronic infections, most bacteria live within biofilms (22). *B. subtilis* biofilm matrix is mostly composed of exopolysaccharides and amyloid-like fibers, which synthesis is encoded by the *epsA-O* operon and the *tapA-sipW-tasA* operon, respectively (23). Matrix production, and thus biofilm formation, is triggered by a variety of environmental and physiological signals, including the lipopeptide surfactin, plant polysaccharides and a combination of glycerol and manganese (24-26). In a planktonic population, the expression of the matrix production operons *epsA-O* and *tapA-sipW-tasA* is inhibited by the transcriptional repressor SinR (27).

Studies have suggested that biofilms are hotspots for the transfer of conjugative plasmids due to the high proximity of cells within this multicellular structure, but the importance of the extracellular matrix in this process is unexplored (28, 29). Also, many of the pathogens that have acquired antibiotic resistance through conjugative elements can form biofilms (30-32). However, despite their fundamental importance in antibiotic resistance gene dissemination, ICE propagation in biofilms has not yet been examined. Here, we take advantage of the extensive knowledge of *ICEBsI* and *B. subtilis* biofilms to evaluate the dynamics of *ICEBsI* dissemination within biofilms. Using media that does or does not

induce biofilm formation as support for conjugation, we report here that natural *ICEBsI* transmission is a hundred to a thousand-fold more efficient when cells are forming a biofilm, even when recipient cells outnumber donor cells. However, while biofilm formation increases conjugation, it does not influence *ICEBsI* excision, suggesting that its effect occurs at the contact level. Accordingly, we observed that biofilm extracellular matrix is crucial for enhanced *ICEBsI* transfer in biofilms.

2.2.4 Results

2.2.4.1 Biofilm enhances the conjugative transfer of *ICEBsI*

Throughout the years, many aspects of *ICEBsI* regulation and transmission were characterized using a domesticated strain of *B. subtilis*, incapable of forming a biofilm (10, 33). Here, we wanted to assess the real impact of biofilm on *ICEBsI* transfer and thus, without artificial induction. Mating assays were performed using NCIB3610, an undomesticated *B. subtilis* strain that forms strong and well-characterized biofilms and contains a kanamycin selection marker in *ICEBsI*, as donor cells. Recipient cells were constructed by curing NCIB3610 of *ICEBsI* (*ICEBsI*⁰) as described previously (10). To discriminate between the effects of media composition versus biofilm induction, pairs of complex rich media and defined minimal media were used as conjugative support. For each pair, one medium induces biofilm formation (LBGM and MSgg) while the other does not (LB and MSNc) (24, 25, 34) (Figure S1A). Donor and recipient cells were mated in a 1:1 ratio, spotted and incubated for 20 h on the various solid media. Conjugation efficiency was determined by plating serial dilutions of mating mixtures on selective media. Strikingly, we observed that the efficiency of exconjugant formation on biofilm inducing media, compared to the conjugation on non-inducing media, increased between 100-fold (minimal media; compare MSgg with MSNc) to 10 000-fold (rich media; compare LBGM

with LB) (Figure 2.1A). Importantly, these very high levels of transfer were obtained without the need to artificially activate *ICEBsI* excision or add a DNA damaging reagent such as mitomycin C. Similarly, formation of floating biofilms (pellicles) in liquid biofilm-inducing media induced high levels of *ICEBsI* transfer while media not inducing biofilms, in which cells are in planktonic form, showed no *ICEBsI* transfer (Figure 2.1A).

To confirm that increased conjugative *ICEBsI* transfer explains the high level of exconjugant formation in biofilms, we performed mating assays on MSgg using deletion mutants for *nicK* and *cwlT*, which encode for the relaxase and a cell wall hydrolase associated with *ICEBsI* type IV secretion system, respectively (17, 35). As expected, transfer efficiencies dropped significantly for donors with either deletion (Figure 2.1B), indicating that conjugation is the main HGT mechanism used for *ICEBsI* acquisition in biofilm. Of note, on MSgg, *nicK* and *cwlT* mutants exhibited a residual frequency of exconjugant formation of 10^{-5} , i.e. less than 1 % of WT. Since extracellular DNA is a common feature of biofilm matrix, these exconjugants could result from acquisition of genetic material via transformation (27, 36). We tested this hypothesis by doing conjugation assay with donor and recipient cells mutated for *comK*, the competence transcription factor of *B. subtilis* required for transformation (37), and *nicK* donor cells. As shown in Figure S2, conjugation- and transformation-deficient cells did not produce any *kan*⁺ *cat*⁺ (exconjugants) cells on MSgg, confirming that natural transformations is responsible for approximately 1 out of a 100 *kan*⁺ *cat*⁺ cells formed in biofilm. However, since the contribution of natural competency is negligible, mating assays performed with *comK* or WT cells showed similar efficiencies of exconjugant formation in biofilms (Figure 2.1C).

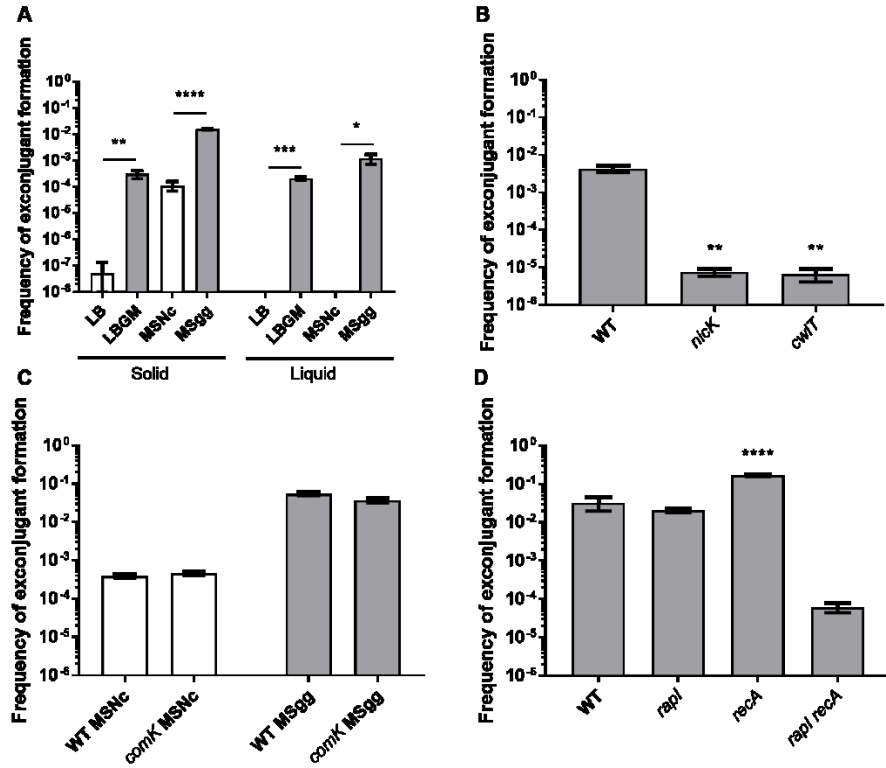


Figure 2.1. Biofilm formation enhances *ICEBsI* transfer. (A) Donor cells with a kanamycin resistance cassette inserted in *ICEBsI* were mated with recipient cells bearing an intergenic chloramphenicol resistance cassette between *ycbU* and *lmrB* in a 1:1 ratio on non-biofilm inducing solid and liquid media (white bars; LB and MSNc) and biofilm-inducing solid and liquid media (grey bars; LBGM and MSgg). Statistical analysis indicate a significant increase in *ICEBsI* transfer when biofilm is formed (Student's t-Test, * = $P < 0.05$, ** = $P < 0.01$, *** = $P < 0.001$, **** = $P < 0.0001$). (B) Conjugation deficient donor cells (*nick* and *cwlT*) were mated with WT cells on MSgg to assess mating efficiency. Statistical analysis showed a significant decrease in mating efficiency with the *nick* and *cwlT* donor cells (One-way ANOVA, ** = $P < 0.01$). (C) Transformation deficient cells (*comK*) were mated on MSNc and MSgg and mating efficiency was compared to WT cells. Statistical analysis showed no significant difference in mating efficiency between *comK* and WT cells (Student's t-Test). (D) Single and double mutant of *ICEBsI* activation pathways donor cells were mated with WT recipient cells on MSgg. Statistical analysis

showed a significant increase of *ICEBsI* mating efficiency between *recA* and WT donor cells, but not with the *rapI* mutant (One-way ANOVA, **** = $P < 0.0001$). While the double mutant showed a decrease in mating efficiency, that difference was not significant. For all panels, mating efficiency was measured after 20 h for solid media and 28 h for liquid media at 30°C. Results shown are representative of at least three independent experiments and error bars represent the standard error of the mean (SEM).

In *B. subtilis*, RapI and RecA are both capable of lifting inhibition on *ICEBsI* excision and transfer (10). To evaluate which pathway regulates *ICEBsI* transfer during biofilm formation, we performed mating assays on MSgg using *rapI* or *recA* null mutants as donors. We observed that neither led to a significant decrease of mating efficiency and that *recA* donor cells exhibited 5 to 10-fold higher mating efficiency. These results suggest either that a third unknown *ICEBsI* activation pathway is active in biofilms, or that both RapI and RecA pathways are redundant in biofilms. To discriminate between these two hypotheses, we tested mating efficiency of a *rapI recA* donor strain, and observed a thousand-fold decrease in mating efficiency compared to the WT (Figure 2.1D). These results suggest that both *ICEBsI* activation pathways are active during biofilm formation, and that they are redundant in biofilm. Interestingly, the frequency of exconjugant formation with *nicK*, *cwlT* or the *rapI recA* donors were comparable (Figure 2.1B and 2.1D), further strengthening the notion that *rapI* and *recA* are the only *ICEBsI* activators in biofilm.

2.2.4.2 Biofilm allows for highly efficient conjugation in low donor/recipient ratio

The 1:1 ratio of donor:recipient cells often used to assess conjugation *in vitro* is probably not frequently encountered in the environment. Therefore, we performed mating assays on MSgg using donor:recipient ratios ranging from 1:1 to $1:10^6$. We observed that exconjugant

formation frequency was at its highest when recipient cells outnumbered donor cells by 10 to 100 times, whereas similar efficiencies were obtained between the 1:1 and the 1:10³ ratios and lower ratios showed decreased efficiency (Figure 2.2). These observations can be partially explained by the *ICEBsI*-encoded quorum-sensing system RapI-PhrI, since extracellular PhrI would not be sufficient to inhibit the RapI activator upon low donor cell density in the population. Alternatively, diffusion of PhrI could be hampered in the presence of the biofilm matrix. Of note, it is possible that newly formed exconjugants transfer *ICEBsI* immediately after receiving it, which would compensate for the low initial level of donor cells. These results indicate that a small population of donor cells can efficiently transfer *ICEBsI* in a biofilm community.

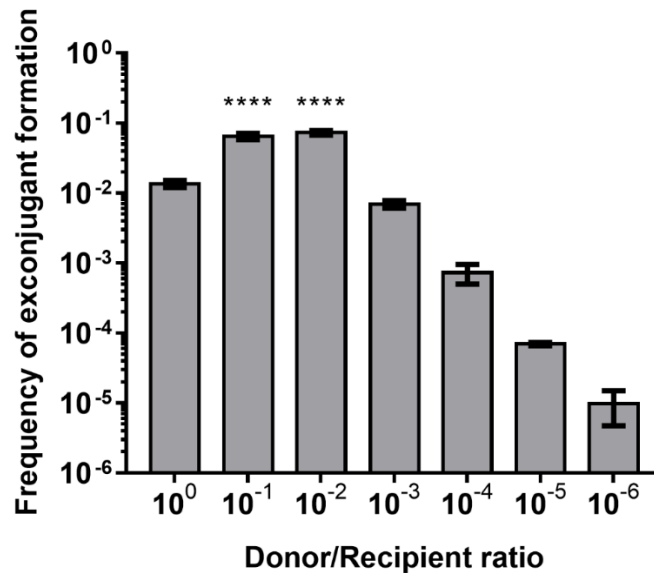


Figure 2.2. Lower donor/recipient ratio allows increased *ICEBsI* transfer in biofilm.

WT donor cells were diluted and mated with a fixed number of WT recipient cells on MSgg. Transfer efficiency was measured after 20 h at 30°C. 1:10 and 1:100 donor-to-recipient ratio show significantly more *ICEBsI* transfer efficiency than 1:1 ratio (One-way ANOVA, **** = $P < 0.0001$). Results shown are representative of at least three independent experiments and error bars represent the SEM.

2.2.4.3 Conjugation activation and biofilm formation are simultaneous

Since biofilm formation positively influences *ICEBsI* transfer, we examined the timing of conjugation in relation to biofilm formation. Mating efficiency was assessed on MSgg at different time points using donor and recipient cells encoding the P_{tapA} -*yfp* reporter. In this reporter gene construction, the yellow fluorescent protein (YFP) is under the control of a matrix-gene promoter, thus allowing its expression concomitantly to matrix production, which can therefore be evaluated by quantification of fluorescent cells in a population by flow cytometry (24, 38). On solid MSgg medium, we observed a steady increase in both mating efficiency and biofilm matrix induction from 8 to 20 h after inoculation (Figure 2.3), indicating a temporal correlation between biofilm formation and conjugation.

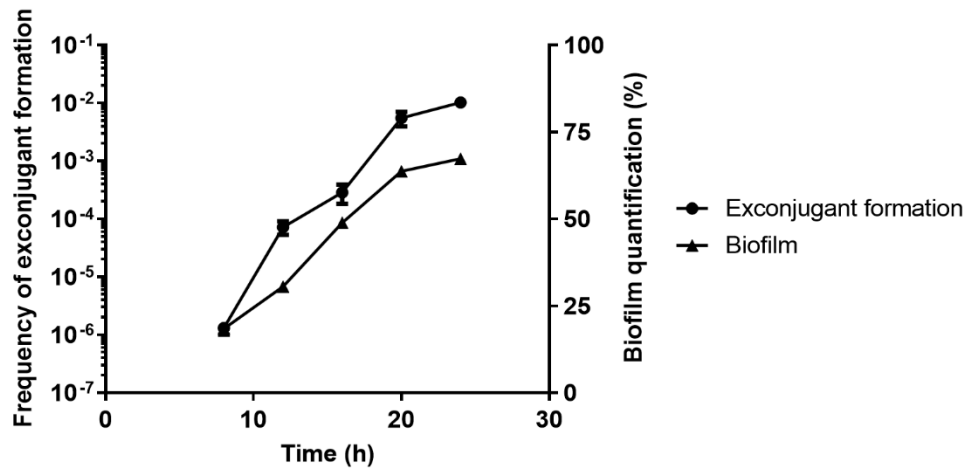


Figure 2.3. Biofilm formation and *ICEBsI* conjugation activation are simultaneous.

Recipient and donor cells harboring a P_{tapA} -*yfp* fluorescent marker in the *amyE* locus were mated on MSgg. Biofilms were then harvested after 8, 12, 16, 20 and 24h. For each time-point, cells were used to quantify biofilm expression with FACS and to assess mating efficiency. Results shown are representative of at least three independent experiments and error bars represent the SEM.

2.2.4.4 Biofilm formation does not alter excision of ICEBs1

The increase of conjugation throughout biofilm formation could be due to a gradual increase in ICEBs1 excision, which is under the control of several signalling pathways. To examine this hypothesis, we determined ICEBs1 excision level in biofilm-forming conditions by monitoring the formation of *attB* site in donor cells using qPCR. Since quorum sensing can influence ICEBs1 excision, we used a 1:1 donor:recipient ratio. Accordingly, we constructed recipient cells in which an erythromycin resistance cassette was inserted at the hybridization site of one of the qPCR primer. In this context, the recipient unoccupied *attB* site cannot be amplified although the site remains functional (see Figure S3). Surprisingly, there was no significant increase of ICEBs1 excision in donor cells on biofilm inducing media when compared to non-inducing media (Figure 2.4A). We also followed ICEBs1 excision in donor cells over time using the same time points as the conjugation assay previously described and observed low levels of excision between 4h and 24h (Figure S4). Of note, this method does not allow us to evaluate excision rates in exconjugants, which may lead to an underestimation of the subset of cells bearing excised ICEBs1. However, these results show that biofilm formation does not alter ICEBs1 excision in donor cells.

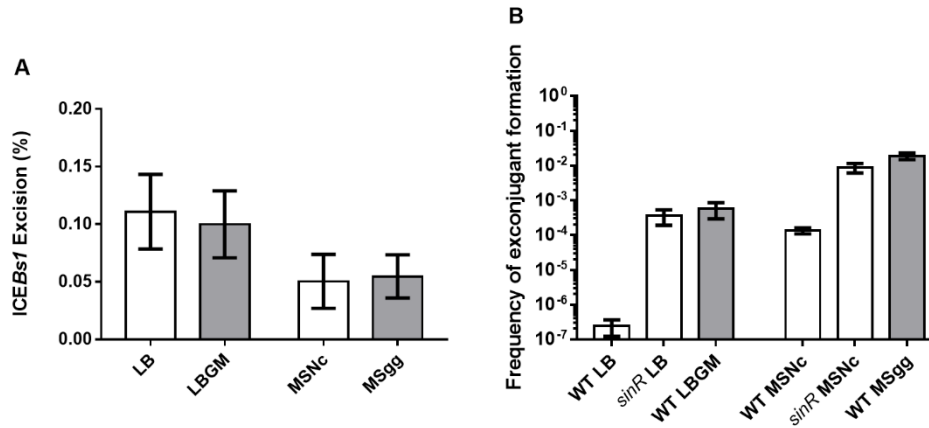


Figure 2.4. Matrix production is important for conjugation. (A) WT donor cell and *ICEBs1*⁰ *attB*-down recipient cells were mated on LB, LBGM, MSNc and MSgg for 20 h at 30°C and donor *attB* site was amplified by qPCR. There is no significant difference in *ICEBs1* excision rate when there is biofilm formation (Student's t-Test). (B) *sinR* donor and recipient cells were mated on non-inducing media and mating efficiency was compared to WT cells mated on non-biofilm (white bars; LB and MSNc) and biofilm solid media (grey bars; LBGM, MSgg and *sinR* mutants). Mating efficiency was measured after 20 h at 30°C. *sinR* mutants led to higher *ICEBs1* transfer efficiency when compared to WT cells on non-inducing media. For all panels, results shown are representative of at least three independent experiments and error bars represent the SEM.

A second hypothesis to explain the positive effect of biofilm on conjugation is that the biophysical context provided by the extracellular matrix highly favours conjugative transfer. To test this idea, we used donor and recipient cells deleted for *sinR*, the transcriptional repressor of the *tapA-sipW-tasA* and *epsA-O* operons responsible for matrix production. A *sinR* mutant constitutively produces the biofilm matrix, even on non-biofilm-inducing media, with little effect on the upstream signalization pathways (27). This single mutation is sufficient to form robust biofilm, regardless of the media (Figure S1B). As shown in Figure 2.4B, transfer efficiency using *sinR* cells on both non-biofilm media was

similar to WT cells on biofilm-inducing media. These results demonstrate that matrix production is sufficient to promote efficient transfer of *ICEBsI* in non-biofilm conditions. To evaluate the importance of cell-contact mediated by biofilm matrix for conjugative transfer versus the possible effects of *sinR* mutants or biofilm-inducing media on other cell processes, we examined *ICEBsI* transfer in WT and *sinR* cells in planktonic (shaking) LB, LBGM, MSNc and MSgg. Importantly, WT in shaking biofilm-inducing media did not transfer *ICEBsI* at all (LBGM) or at a lower rate than in biofilm conditions (floating pellicles) at similar donor and recipient cell density (Figure S5). Also, *sinR* cells in all media and WT cells in MSgg rapidly clump despite agitation and show *ICEBsI* transfer, suggesting that these cell aggregates mediated by matrix secretion are a microenvironment favouring conjugative transfer (Figure S5). Together, these results suggest that maximum transfer rates are obtained when biofilm matrix is produced and hold cells together.

TasA was shown to bind cell together in the biofilm, and matrix exopolysaccharides were suggested to favour adhesion on neighbouring cell chains in complex community development (39, 40). To strengthen the hypothesis that biofilm formation can provide a favourable context for conjugation by bringing cells closer or by stabilizing cell-cell contacts, we mated donor and recipient cells incapable of producing matrix (*epsA-O* and *tasA* mutants) on MSNc. We decided to emulate the binding effect provided by the extracellular matrix by adding 1 % agarose, which is expected to move the matrix-deficient cells closer and stabilize their contact. We observed that addition of agarose to *eps tasA* mutants increased *ICEBsI* transfer efficiency (Figure S6), suggesting that the polymer helps to stabilize the contact between cells the same way the extracellular matrix can, albeit to a lesser degree.

2.2.4.5 Matrix production by recipient cells is important for optimum conjugation in biofilm

The results obtained with *sinR* mutants suggest that the biofilm matrix acts as a structure promoting cell-cell contacts and optimal ICEBsI conjugative transfer. This hypothesis was further verified by carrying out mating assays with cells incapable of secreting matrix, i.e. *eps tasA* mutants. In *B. subtilis*, the *epsA-O (eps)* and *tasA* operons produce two major matrix components, exopolysaccharides and the TasA amyloid-like fibers, respectively (23). As shown in Figure 2.5A, production of the extracellular matrix polymers was required for efficient ICEBsI transfer on biofilm-inducing medium. Indeed, mating assays using mutant donor and recipient cells yielded transfer efficiencies similar to those observed on a minimal non-biofilm medium. Interestingly, while donor cells deficient for matrix production could still efficiently conjugate with WT recipient cells, mating WT donor with non-matrix producer recipient cells significantly reduced transfer (Figure 2.5A). This result suggests that the biofilm matrix production of the recipient cells is particularly important for efficient ICEBsI transfer.

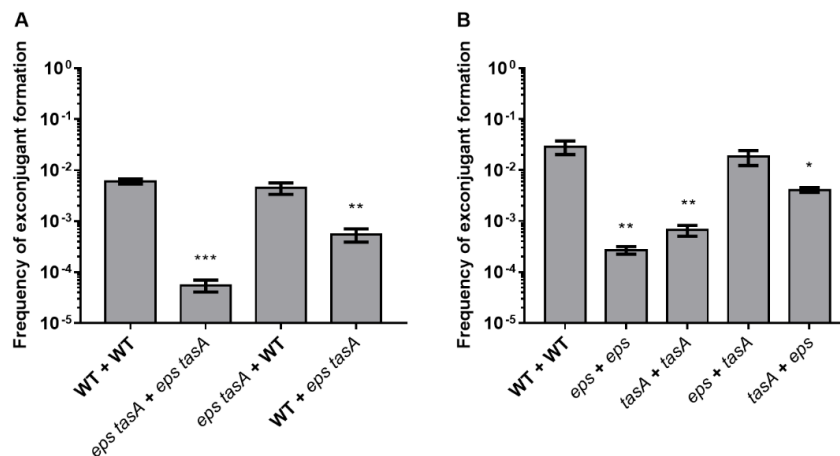


Figure 2.5. Both matrix components are important for ICEBsI conjugation. (A) Donor and recipient cells deleted for *epsA-O* (*eps*) and *tasA* operons were mated together or with WT cells on MSgg. The first genotype shown represents the donor genotype, while the second represent the recipient. Statistical analysis showed that absence of matrix and non-production from the recipient cells reduced significantly ICEBsI transfer efficiency (One-way ANOVA, ** = $P < 0.01$, *** = $P < 0.001$). (B) Donor and recipient cells mutated for either *eps* or *tasA* operon were mated on MSgg. Statistical analysis showed that absence of either exopolysaccharides or amyloid-like fibers in both donor and recipient decreases ICEBsI transfer significantly. However, *eps* donors and *tasA* recipients can complement each other and restore WT-level of conjugation, while *tasA* donors and *eps* recipient are significantly different from WT pairs (One-way ANOVA, * = $P < 0.05$, ** = $P < 0.01$). For both panels, mating efficiency was measured after 20 h at 30°C. Results shown are representative of at least three independent experiments and error bars represent the SEM.

To examine the importance of both components for conjugation, mating assays with donor and recipient lacking either *eps* or *tasA* were performed. As shown in Figure 2.5B, both components of the matrix were instrumental for efficient ICEBsI transfer, stressing the importance of the matrix integrity for maximal conjugation. Various reports have shown that *eps* and *tasA* mutants can complement each other extracellularly to establish biofilm

both *in vitro* and on plant roots (23, 24). Interestingly, combination of these mutants can also restore conjugation efficiency, but only when TasA is produced by donor cells (*eps* mutant) and the exopolysaccharides are produced by recipient cells (*tasA* mutant). The reverse combination resulted in a 5-fold reduction of transfer efficiency compared to WT cells (Figure 2.5B). This result confirms that the extracellular matrix is essential for ICEBsI transfer in biofilms, and that matrix production by recipient cells is essential for optimal transfer.

2.2.5 Discussion

ICEBsI regulation and its transfer mechanism have been thoroughly characterized in the last decade. However, as it is also the case for most conjugative elements, its transfer between cells within a biofilm has not been previously studied. Here, we show that biofilm formation greatly increases conjugation of ICEBsI, allowing for high efficiency transfer in the absence of added DNA damaging reagents.

Using donor cells carrying *nick* and *cwlT* deletion mutations, both unable to transfer ICEBsI, we validated that the high transfer observed in biofilm is due to conjugation events (Figure 2.1B). However, we also observed a 10^{-5} background level of *kan*⁺ *cat*⁺ “exconjugant” cell formation using *nick*, *cwlT* or *rapI recA* deleted donor cells, the latter being unable to excise ICEBsI (Figure 2.1B and 2.1D). Further experiments allowed us to determine that these *kan*⁺ *cat*⁺ cells arose by natural transformation, via transfer of the *kan*^R gene present in ICEBsI to recipient cells or the transfer of the *cat* gene present in recipient cells to donor cells (Figure S2 and data not shown). These observations suggest that natural transformation contributes to approximately 1 out of 100 of HGT observed on MSgg, and thus is also fairly efficient to promote gene transfer in biofilms formed by non-domesticated strains.

The minimal biofilm-inducing medium (MSgg) provided the highest frequency of *ICEBsI* exconjugant formation, i.e. 10^{-2} . Interestingly, *rapI* overexpression in a domesticated, non-biofilm *B. subtilis* strain also gives similar transfer efficiency, suggesting that it might be the upper limit for *ICEBsI* transfer in a 1:1 ratio (10, 41). This transfer efficiency, obtained without artificial activation of *ICEBsI* excision, demonstrates the high mobility of this element. *ICEBsI* is therefore one of the ICEs transferring at the highest rate in the Firmicutes. Indeed, *Staphylococcus aureus* ICE6013, an ICE closely related to *ICEBsI*, has a mating efficiency of around 10^{-5} (42). Tn916, an ICE found in a variety of Gram-positive bacteria, was reported to transfer at frequencies ranging from 10^{-9} to 10^{-4} (43, 44), while *Streptococcus agalactiae* TnGBS1 and TnGBS2 transfer at around 10^{-5} (45). Finally, *Streptococcus thermophilus* ICESt3 transfers at a rate of 3.4×10^{-6} , and only one conjugation event was ever reported for ICESt1 (46). However, in the studies mentioned above, filter mating assays, which generally do not promote biofilm formation, were used to assess mating efficiencies. Our study demonstrates that to evaluate naturally relevant conjugation transfer of ICEs, the transfer rate within a biofilm must be examined.

Variable donor:recipient ratios ranging from 1:1 to $1:10^3$ in the mating population did not decrease the frequency of recipient cells acquiring *ICEBsI*. This observation is very important, since it reflects how a genetic element, present in a small subset of an initial population, can propagate rapidly and efficiently. In fact, 1:10 to $1:10^2$ ratio led to a higher mating efficiency than a 1:1 ratio (Figure 2.2). This observation was previously reported for *ICEBsI* (10), but was never explored in a biofilm-related setting. This increase in efficiency could be explained by the RapI-PhrI quorum sensing system, since a smaller amount of donor cells in the biofilm leads to a low level PhrI in the extracellular environment, thus favouring the action of the RapI activator (10). A similar system was described in *E. faecalis*, where a lower donor cell density led to higher transfer efficiency of conjugative plasmids pAD1 and pAM373 that both encode a secreted conjugation

inhibitor (iAD1 and iAM373 respectively) (47). However, quorum-sensing regulation of excision has been observed only in a limited subset of genetic elements. For many others, DNA damage and/or environmental conditions such as reaching stationary phase or the presence of sub-inhibitory concentrations of antibiotics trigger ICE excision (48-50). *ICEBsI* excision is also induced by DNA damage via the *recA* pathway, but *recA* donors showed better conjugation efficiency than WT donors (Figure 2.1D). A similar increase of mating efficiency with a *recA* donor was observed previously (51). This result can be explained by the poor growth of *recA* mutants, known to have a slower doubling time (52). While cells were initially mated at a 1:1 donor for recipient ratio, we observed that after 20 h, the ratio had become approximately 1:50 (Table S1), leading to a higher mating efficiency (Figure 2.2).

Somewhat surprisingly, we observed that biofilm formation does not induce excision of *ICEBsI* in donor cells. Despite the low excision rate (~0.2 %), transfer levels in biofilms were similar to those obtained with donor cells overexpressing *rapI*, for which excision rates reach approximately 90 % (10, 51). Of note, ~0.2 % is more than 10 times as high as the excision rate observed in an uninduced domesticated strain (51). *ICEBsI* is known to replicate in rolling-circle, and can be present in multiple copies in the donor cell (16). Thus, we hypothesize that in biofilm forming conditions, *ICEBsI* rapidly reintegrates into its host chromosome following replication. The extrachromosomal copies would then be transferred to recipient cells, explaining the efficient transfer despite low excision levels. Another hypothesis underlying the high conjugative transfer of *ICEBsI* in biofilm could be the presence of abundant cell chains. Indeed, *ICEBsI* transfers exceptionally well through bacterial chains (53), and these structures are frequently found in biofilms, which could help propagate *ICEBsI* much more efficiently (23, 34). Considering the very low excision rate and the high conjugative transfer, it is also extremely likely that a single donor cell can propagate *ICEBsI* to multiple recipients in biofilms. It is also likely that once a recipient receives *ICEBsI*, it can immediately become a donor, further spreading it in the population.

Importantly, the excision rate is not necessarily correlated with conjugation efficiency, as shown for Tn916 (43).

Many conjugative elements encode surface factors that stabilize the contact between donor and recipient cells, such as conjugative pili in Gram-negative and adhesins in Gram-positive bacteria (54, 55). While it is unknown whether ICEBs1 encodes for surface factors, its low transfer efficiency in liquid compared to solid media suggests that no such factors are expressed in these conditions (56). Here, we have shown that both components of the extracellular matrix are required for the positive effect of biofilm on conjugation, suggesting that these polymers could help stabilize the donor-recipient pair and compensate for the lack of adhesion factors of ICEBs1. Other conjugative elements that are not known to encode adhesion factors, such as pCW3 and Tn916, are found in the biofilm forming bacteria *Clostridium perfringens* and *E. faecalis*, respectively (57-59). Lack of adhesion factors in those elements could be compensated by the ability of their host cells to form biofilms.

Experiments with single and double biofilms mutants allowed us to determine the individual importance of both matrix components in conjugation. Interestingly, matrix production from the recipient cells, but not from the donor cells, are likely essential for efficient transfer (Figure 2.5A). This observation could be explained by the fact that recipient that do not produce matrix will not form cell chains, and thus lead to less efficient ICEBs1 transfer. It also suggests that cells within a biofilm might be able to receive ICE from either biofilm or non-biofilm forming cells, making the biofilm a very receptive environment for genetic elements transfer. These results allow us to better understand conjugative element dynamics in natural and clinical environments, where biofilms are ubiquitous. Biofilm matrix could thus have a considerable impact on the dissemination of mobile genetic elements, such as for the clinically important *S. aureus* and *C. difficile* which can acquire multiple antibiotic resistance through ICEs (60, 61).

2.2.6 Material and Methods

2.2.6.1 Strains and Media

The strains used in this study are derivatives of the ancestor strain NCIB 3610 (Table S2). The different media used for mating assays are LB (Luria Bertani; 1 % tryptone, 0.5 % yeast extract, 0.5 % NaCl), LBGM (LB + 1 % glycerol and 0.1 mM MnCl₂) (25), MSNc (5mM potassium phosphate buffer pH 7, 0.1 M MOPS pH 7, 2 mM MgCl₂, 0.05 mM MnCl₂, 1 μM ZnCl₂, 2 μM thiamine, 700 μM CaCl₂, 0.2 %, NH₄Cl, 0.5 % cellobiose) (24) and MSgg (5mM potassium phosphaste buffer pH 7, 0.1 M MOPS pH 7, 0.025 mM FeCl₃, 2 mM MgCl₂, 0.05 mM MnCl₂, 1 μM ZnCl₂, 2 μM thiamine, 700 μM CaCl₂, 0.5 % glycerol, 0.5 % glutamate) solidified with 1.5 % agar (34). Media did not affect significantly bacterial growth, with biofilm inducing media leading to slightly more yield compared to non-inducing media (Table S3). When needed, the following antibiotic were added to media: MLS (1 μg ml⁻¹ erythromycin, 25 μg ml⁻¹ lincomycin), spectinomycin (100 μg ml⁻¹), tetracycline (10 μg ml⁻¹), chloramphenicol (5 μg ml⁻¹), and kanamycin (10 μg ml⁻¹).

2.2.6.2 Strain construction

Most strains were made by transferring genetic construction present in domesticated strains in NCIB 3610, using SPP1-mediated generalized transduction (62). JMA348 (*ICEBsI::kan*), CAL51 (*(rapIphrI)342::kan*), JMA208 (*immR::cat*) and CAL419 (*ICEBsI⁰ comK::cat*) were kind gifts from Dr. Alan D. Grossman (Massachusetts Institute of Technology, MA, USA), and 3610 *ICEBsI⁰* strains were cured from *ICEBsI* and verified

as described in (Auchtung et al., 2005). Briefly, MG9 (3610 *immR::cat*) was inoculated in LB, grown for 4 h, diluted at OD₆₀₀ = 0,01 in fresh LB and grown overnight at 37°C. The culture was then diluted back to OD₆₀₀ = 0,01 in fresh LB and grown until the culture reached OD₆₀₀ = 1. The cells were then plated on LB agar, grown overnight at 37°C and colonies were streaked on LB with or without chloramphenicol. Colonies that lost the resistance were then PCR verified for ICEBsI excision with the following primers (5'-3'): P197- GAC GAA TAT GGC AAG CCT ATG TTA C and P198- GGG TAT ACA ATC ATG GGT GAT CGA G.

Long-flanking homology PCR was used to insert a spectinomycin cassette between *ycbU* and *lmrB* and to create the recipient used for qPCR (JSB18). The primers used for the *ycbU-lmrB::spec* insertion were (5'-3'): P246- CCA TTG ATG TGA AGG AAT GGG GCG TA, P247- CGT TAC GTT ATT AGC GAG CCA GTC ATG TTT ACT TGT GGA TCG TTT TCG CCG, P248- CAA TAA ACC CTT GCC CTC GCT ACG CCT GAA CAC TAG TCA GGG GCT TTT CA and P249- GGC TTA GTC CTC ACT GCA TTT GCA TC. Primers used for the *attB-down::erm* deletion were (5'-3'): P328- CCG TTG GTC AAG CGG TTA AG, P329- GAG GGT TGC CAG AGT TAA AGG ATC TAT TAT TGA GAT GCG GCC GAG, P330- CGA TTA TGT CTT TTG CGC AGT CGG CGT GTG GAA AAT ACG GCT ATG GG and P331- AGT AAG CTT ATT CCA CCC ACT G. PCR products were then introduced in *B. subtilis* 168 by natural competency (63), verified by PCR and transferred in derivatives of *B. subtilis* NCIB3610 by SPP1-mediated generalized transduction (62).

2.2.6.3 Mating assays

Donor and recipient cells were grown in 3 mL LB broth at 37°C overnight, diluted at OD₆₀₀ = 1.5 in LB and mixed at a 1:1 ratio (or the specified ratio, see Figure 2.2). The mix was

then centrifuged 3 min at 5000 rpm. The cell pellet was resuspended in 50 μ L LB and 10 μ l were dropped on the appropriate medium and incubated for 20 h (or the time specified, see Figure 2.3) at 30°C, which is the temperature at which *B. subtilis* biofilm grow efficiently. For mating assays in liquid, 10 μ l of bacterial mix were used to inoculate 3 ml of media for shaking conditions, while 3.33 μ l were used to inoculate 1 ml of media found in 24-well plate for pellicle mating; both were also done at 30°C. Pellicles were incubated 28 h rather than 20 h, since growth dynamic is slower in non-shaking conditions. For mating assays using agarose, cells were resuspended in 50 μ l of warm (55°C) 1 % molecular grade agarose before being dropped on agar medium. Cells were then collected with 1 mL LB broth and sonicated at 30 % amplitude for 20 seconds two times for cells grown 20 h on biofilm inducing media. Microscopy observation allowed us to determine that sonication was sufficient to obtain single cells. Cells were then serially diluted and plated on LB with the appropriate antibiotics. Donors, recipients and exconjugants were then counted. We expressed the frequency of exconjugant formation in function of the number of recipients (number of exconjugants divided by number of recipients), because the starting donor amount varies in some experiments (see Figure 2.2).

2.2.6.4 Flow cytometry

Mating assays were performed on MSgg as described above, using FL60 and FL63 strains. For each time point, three biofilms were harvested with 500 μ L PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7.4) and disrupted with up and down pipetting. Subsequent steps were performed as described previously (38). Flow-cytometry analysis was performed on a BD FACSJazz (BD Biosciences).

2.2.6.5 ICEBs1 excision quantification

ICEBs1 excision was evaluated using qPCR. Donor and recipient cells were mated on MSgg as described above, cells were harvested and flash-frozen at the appropriate time point. Genomic DNA was extracted using BioBasic genomic DNA extraction kit, and qPCR was performed on the *attB* site (created when ICEBs1 excise from the chromosome) using the following primers (5'-3'): P358- GCC TAC TAA ACC AGC ACA AC and P333- AAA GGT GGT TAA ACC CTT GG. Since the recipient strain (JSB18) contains an erythromycin resistance cassette in the hybridization site of the P333 primer, amplification is only possible for donor cells in which ICEBs1 is excised. qPCR on a chromosomal chloramphenicol resistance cassette present only in the donor genome was performed for normalization (Δ Ct) of donor cells, using the following primers (5'-3'): P363- AGA ACT GGT TAC AAT AGC GAC GGA GAG and P366- CCC CGA ACC ATT ATA TTT CTC TAC ATC AGA AAG G. Percentage of excision is calculated as the $\Delta\Delta$ Ct using culture of the control strain ICEBs1⁰ *ynlF/yboA::Tn917::amyE::cat* grown in the same conditions, which is considered as being 100 % excised.

2.2.6.6 Stereomicroscopy

Donor and recipient WT and *sinR* cells were mated on LB, LBGM, MSNc and MSgg as described above. Photographs of colonies were taken after 20 h at 30°C with a Leika M165 FC (Leika).

2.2.6.7 Statistical analyses

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 7. Comparisons were done using Student t-test or one-way ANOVA followed by Turkey's multiple comparison test, both with 95 % confidence interval.

2.2.7 Acknowledgments

We thank Pr. Alan D. Grossman and Pr. Roberto Kolter for their kind gift of strains; Alain Lavigueur and Pr. Alexandre Maréchal for critical reading of the manuscript; and members of Beauregard, Burrus and Rodrigue lab for helpful discussions.

2.2.8 References

1. Ochman H, Lawrence JG, Groisman EA. 2000. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* 405:299–304.
2. Frost LS, Leplae R, Summers AO, Toussaint A. 2005. Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nat Rev Microbiol* 3:722–732.
3. Moreno Switt AI, den Bakker HC, Cummings CA, Rodriguez-Rivera LD, Govoni G, Raneiri ML, Degoricija L, Brown S, Hoelzer K, Peters JE, Bolchacova E, Furtado MR, Wiedmann M. 2012. Identification and characterization of novel *Salmonella* mobile elements involved in the dissemination of genes linked to virulence and transmission. *PLoS One* 7:e41247.
4. Garriss G, Waldor MK, Burrus V. 2009. Mobile antibiotic resistance encoding elements promote their own diversity. *PLoS Genet* 5:e1000775.
5. Sullivan JT, Ronson CW. 1998. Evolution of rhizobia by acquisition of a 500-kb symbiosis island that integrates into a phe-tRNA gene. *Proc Natl Acad Sci* 95:5145–5149.
6. Aviv G, Rahav G, Gal-Mor O. 2016. Horizontal transfer of the *Salmonella enterica* serovar Infantis resistance and virulence plasmid pESI to the gut microbiota of warm-blooded hosts. *mBio* 7:e01395-16.
7. Yamamoto M, Matsumura Y, Gomi R, Matsuda T, Tanaka M, Nagao M, Takakura S, Uemoto S, Ichiyama S. 2016. Interspecies dissemination of a mobilizable plasmid harboring *bla*_{IMP-19} and the possibility of horizontal gene transfer in a single patient. *Antimicrob Agents Chemother* 60:5412–5419.
8. Lee CA, Thomas J, Grossman AD. 2012. The *Bacillus subtilis* conjugative transposon ICEBsI mobilizes plasmids lacking dedicated mobilization functions. *J Bacteriol* 194:3165–3172.

9. Douard G, Praud K, Cloeckaert A, Doublet B. 2010. The *Salmonella* genomic island 1 is specifically mobilized *in trans* by the IncA/C multidrug resistance plasmid family. PLoS One 5: e15302.
10. Auchtung JM, Lee CA, Monson RE, Lehman AP, Grossman AD. 2005. Regulation of a *Bacillus subtilis* mobile genetic element by intercellular signaling and the global DNA damage response. Proc Natl Acad Sci 102:12554–9.
11. Earl AM, Losick R, Kolter R. 2007. *Bacillus subtilis* genome diversity. J Bacteriol 189:1163–1170.
12. Bais HP, Fall R, Vivanco JM. 2004. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* Roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. Plant Physiol 134:307–319.
13. Arkhipova TN, Veselov SU, Melentiev AI, Martynenko E V., Kudoyarova GR. 2005. Ability of bacterium *Bacillus subtilis* to produce cytokinins and to influence the growth and endogenous hormone content of lettuce plants. Plant Soil 272:201–209.
14. Allard-Massicotte R, Tessier L, Lécuyer F, Lakshmanan V, Lucier JF, Garneau D, Caudwell L, Vlamakis H, Bais HP, Beauregard PB. 2016. *Bacillus subtilis* early colonization of *Arabidopsis thaliana* roots involves multiple chemotaxis receptors. mBio 7: e01664-16.
15. Auchtung JM, Aleksanyan N, Bulku A, Berkmen MB. 2016. Biology of ICEBsI, an integrative and conjugative element in *Bacillus subtilis*. Plasmid 86:14–25.
16. Lee CA, Babic A, Grossman AD. 2010. Autonomous plasmid-like replication of a conjugative transposon. Mol Microbiol 75:268–279.
17. Lee CA, Grossman AD. 2007. Identification of the origin of transfer (*oriT*) and DNA relaxase required for conjugation of the integrative and conjugative element ICEBsI of *Bacillus subtilis*. J Bacteriol 189:7254–7261.

18. Leonetti CT, Hamada MA, Laurer SJ, Broulidakis MP, Swerdlow KJ, Lee CA, Grossman AD, Berkmen MB. 2015. Critical components of the conjugation machinery of the integrative and conjugative element ICEBs1 of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 197:2558–2567.
19. Wright LD, Johnson CM, Grossman AD. 2015. Identification of a single strand origin of replication in the integrative and conjugative element ICEBs1 of *Bacillus subtilis*. *PLOS Genet* 11:e1005556.
20. Høiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. 2010. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents* 35:322–332.
21. Nocelli N, Bogino P, Banchio E, Giordano W. 2016. Roles of extracellular polysaccharides and biofilm formation in heavy metal resistance of rhizobia. *Materials (Basel)* 9:E418.
22. Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. 2004. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* 2:95–108.
23. Branda SS, Chu F, Kearns DB, Losick R, Kolter R. 2006. A major protein component of the *Bacillus subtilis* biofilm matrix. *Mol Microbiol* 59:1229–1238.
24. Beauregard PB, Chai Y, Vlamakis H, Losick R, Kolter R. 2013. *Bacillus subtilis* biofilm induction by plant polysaccharides. *Proc Natl Acad Sci* 110:E1621–E1630.
25. Shemesh M, Chai Y. 2013. A combination of glycerol and manganese promotes biofilm formation in *Bacillus subtilis* via histidine kinase KinD signaling. *J Bacteriol* 195:2747–2754.
26. Lopez D, Fischbach MA, Chu F, Losick R, Kolter R. 2009. Structurally diverse natural products that cause potassium leakage trigger multicellularity in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci* 106:280–285.
27. Kearns DB, Chu F, Branda SS, Kolter R, Losick R. 2004. A master regulator for biofilm formation by *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 55:739–749.

28. Molin S, Tolker-Nielsen T. 2003. Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure. *Curr Opin Biotechnol* 14:255–261.
29. Madsen JS, Burmølle M, Hansen LH, Sørensen SJ. 2012. The interconnection between biofilm formation and horizontal gene transfer. *Immunol Med Microbiol* 65:183–195.
30. Monecke S, Coombs G, Shore AC, Coleman DC, Akpaka P, Borg M, Chow H, Ip M, Jatzwauk L, Jonas D, Kadlec K, Kearns A, Laurent F, O’Brien FG, Pearson J, Ruppelt A, Schwarz S, Scicluna E, Slickers P, Tan H-L, Weber S, Ehricht R. 2011. a field guide to pandemic, epidemic and sporadic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *PLoS One* 6:e17936.
31. Archer NK, Mazaitis MJ, Costerton JW, Leid JG, Powers ME, Shirtliff ME. 2011. Properties , regulation and roles in human disease *Staphylococcus aureus* biofilms. *Virulence* 445–459.
32. Teschler JK, Zamorano-Sánchez D, Utada AS, Warner CJA, Wong GCL, Linington RG, Yildiz FH. 2015. Living in the matrix: assembly and control of *Vibrio cholerae* biofilms. *Nat Rev Microbiol* 13:255–268.
33. Mcloon AL, Guttenplan SB, Kearns DB, Kolter R, Losick R. 2011. Tracing the domestication of a biofilm-forming bacterium. *J Bacteriol* 193:2027–2034.
34. Branda SS, Gonzalez-Pastor JE, Ben-Yehuda S, Losick R, Kolter R. 2001. Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci* 98:11621–11626.
35. DeWitt T, Grossman AD. 2014. The bifunctional cell wall hydrolase CwlT is needed for conjugation of the integrative and conjugative element ICEBsI in *Bacillus subtilis* and *B. anthracis*. *J Bacteriol* 196:1588–1596.
36. Whitchurch CB. 2002. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science* 295:1487.

37. Sinderen D, Luttinger A, Kong L, Dubnau D, Venema G, Hamoen L. 1995. *comK* encodes the competence transcription factor, the key regulatory protein for competence development in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 15:455–462.
38. Vlamakis H, Aguilar C, Losick R, Kolter R. 2008. Control of cell fate by the formation of an architecturally complex bacterial community. *Genes Dev* 22:945–953.
39. van Gestel J, Vlamakis H, Kolter R. 2015. From cell differentiation to cell collectives: *Bacillus subtilis* uses division of labor to migrate. *PLoS Biol* 13: e1002141.
40. Romero D, Aguilar C, Losick R, Kolter R. 2010. Amyloid fibers provide structural integrity to *Bacillus subtilis* biofilms. *Proc Natl Acad Sci* 107:2230–2234.
41. Auchtung JM, Lee CA, Garrison KL, Grossman AD. 2007. Identification and characterization of the immunity repressor (ImmR) that controls the mobile genetic element *ICEBs1* of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 64:1515–1528.
42. Sansevere EA, Luo X, Park JY, Yoon S, Seo KS, Robinson DA. 2017. Transposase-mediated excision, conjugative transfer, and diversity of *ICE6013* elements in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 199: e00629-16.
43. Marra D, Pethel B, Churchward GG, Scott JR. 1999. The frequency of conjugative transposition of *Tn916* is not determined by the frequency of excision. *J Bacteriol* 181:5414–8.
44. Seier-Petersen MA, Jasni A, Aarestrup FM, Vigre H, Mullany P, Roberts AP, Agerso Y. 2014. Effect of subinhibitory concentrations of four commonly used biocides on the conjugative transfer of *Tn916* in *Bacillus subtilis*. *J Antimicrob Chemother* 69:343–348.
45. Guerillot R, Da Cunha V, Sauvage E, Bouchier C, Glaser P. 2013. Modular evolution of *TnGBSs*, a new family of integrative and conjugative elements

associating insertion sequence transposition, plasmid replication, and conjugation for their spreading. J Bacteriol 195:1979–1990.

46. Bellanger X, Roberts AP, Morel C, Choulet F, Pavlovic G, Mullany P, Decaris B, Guedon G. 2009. Conjugative transfer of the integrative conjugative elements ICE*St1* and ICE*St3* from *Streptococcus thermophilus*. J Bacteriol 191:2764–2775.
47. Bandyopadhyay A, O'Brien S, Frank KL, Dunny GM, Hu W-S. 2016. Antagonistic donor density effect conserved in multiple enterococcal conjugative plasmids. Appl Environ Microbiol 82:4537–4545.
48. Delavat F, Miyazaki R, Carraro N, Pradervand N, van der Meer JR. 2017. The hidden life of integrative and conjugative elements. FEMS Microbiol Rev 41:512–537.
49. Johnson CM, Grossman AD. 2015. Integrative and conjugative elements (ICEs): What they do and how they work. Annu Rev Genet 49:577–601.
50. Poulin-Laprade D, Carraro N, Burrus V. 2015. The extended regulatory networks of SXT/R391 integrative and conjugative elements and IncA/C conjugative plasmids. Front Microbiol 6:837.
51. Lee CA, Auchtung JM, Monson RE, Grossman AD. 2007. Identification and characterization of *int* (integrase), *xis* (excisionase) and chromosomal attachment sites of the integrative and conjugative element ICE*Bs1* of *Bacillus subtilis*. Mol Microbiol 66:1356–1369.
52. Ramírez-Guadiana FH, Barajas-Ornelas RDC, Corona-Bautista SU, Setlow P, Pedraza-Reyes M. 2016. The RecA-dependent SOS response is active and required for processing of DNA damage during *Bacillus subtilis* sporulation. PLoS One 11:e0150348.
53. Babic A, Berkmen MB, Lee CA, Grossman AD. 2011. Efficient gene transfer in bacterial cell chains. mBio 2: e00027-11.

54. Bhatta M, Laverde Gomez JA, Christie PJ. 2013. The expanding bacterial type IV secretion lexicon. *Res Microbiol* 164:620–639.
55. Goessweiner-Mohr N, Arends K, Keller W, Grohmann E. 2013. Conjugative type IV secretion systems in Gram-positive bacteria. *Plasmid* 70:289–302.
56. Johnson CM, Grossman AD. 2014. Identification of host genes that affect acquisition of an integrative and conjugative element in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 93:1284–1301.
57. Alvarez-Martinez CE, Christie PJ. 2009. Biological diversity of prokaryotic Type IV Secretion Systems. *Microbiol Mol Biol Rev* 73:775–808.
58. Vidal JE, Shak JR, Canizalez-Roman A. 2015. The CpAL Quorum Sensing System Regulates Production of Hemolysins CPA and PFO To Build *Clostridium perfringens* Biofilms. *Infect Immun* 83:2430–2442.
59. Dale JL, Nilson JL, Barnes AMT, Dunny GM. 2017. Restructuring of *Enterococcus faecalis* biofilm architecture in response to antibiotic-induced stress. *npj Biofilms Microbiomes* 3:15.
60. Haaber J, Penadés JR, Ingmer H. 2017. Transfer of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol* 25:893–905.
61. Mullany P, Allan E, Roberts AP. 2015. Mobile genetic elements in *Clostridium difficile* and their role in genome function. *Res Microbiol* 166:361–367.
62. Yasbin RE, Young FE. 1974. Transduction in *Bacillus subtilis* by bacteriophage SPP1. *J Virol* 14:1343–1348.
63. Harwood CR, Cutting SM. *Molecular Biological Methods for Bacillus*. Wiley, Chichester; 1990.

2.2.9 Supplementary Material

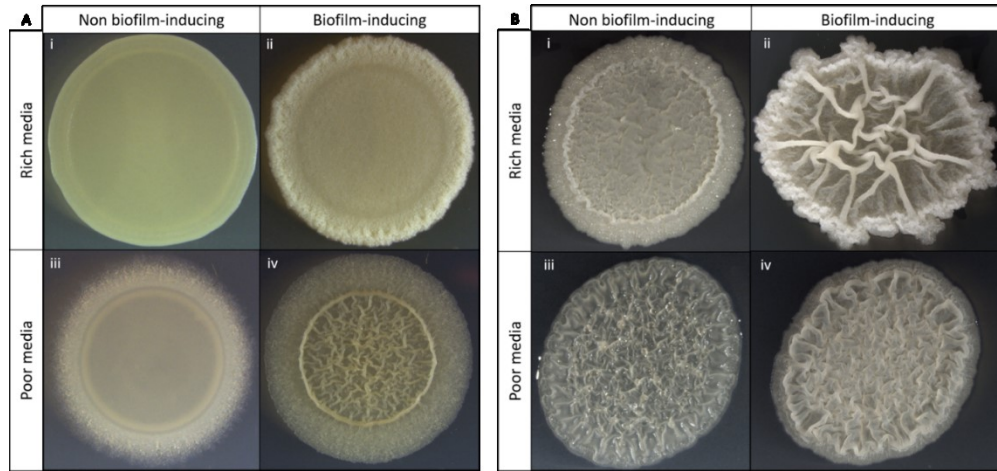


Figure S1. LBGM and MSgg induce biofilm formation. WT (A) and *sinR* (B) donor and recipient cells were mated on LB (i), LBGM (ii), MSNc (iii) and MSgg (iv). Photos were taken after incubation for 20 h at 30°C.

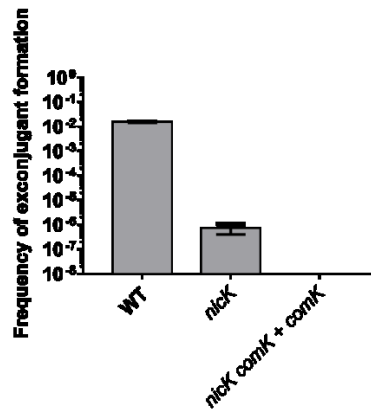


Figure S2. *nicK* residual exconjugant formation is due to natural transformation. Conjugation assays were performed with WT + WT, *nicK* + WT and *nicK comK* + *comK* cells on MSgg. Mating efficiency was measured after 20 h at 30°C. While the *nicK* + WT assay showed a low level of exconjugant formation, *nicK comK* + *comK* lead to a complete

abolition of transfer. Results shown are representative of at least three independent experiments and error bars represent the SEM.

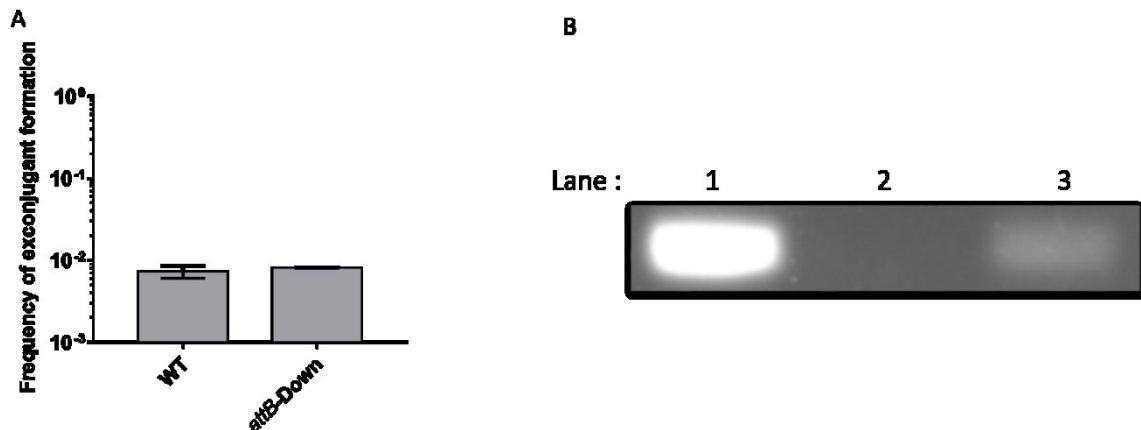


Figure S3. *ICEBs1*⁰ *attB*-down recipient cell can acquire *ICEBs1*, while its *attB* site cannot be amplified. (A) *ICEBs1*⁰ *attB*-down (JSB18) cells were mated on MSgg with WT donor cells to assess its capacity to acquire *ICEBs1* despite an erythromycin cassette inserted near the *attB* site. Mating efficiency was measured after 20 h at 30°C. Statistical analysis showed no significant difference in mating efficiency between the WT recipient cells and JSB18 (Student's t-Test). Results shown are representative of at least three independent experiments and error bars represent the SEM (B) The *attB* site of a WT recipient cell (Lane 1), JSB18 (Lane 2) and a 1:1 mix using JSB18 (Lane 3) as a recipient was amplified by PCR using primers P333 and P358 (see Methods) and run on a 1 % agarose gel. We were able to amplify the *attB* site from the WT recipient cells and the 1:1 mix, but not from JSB18 alone.

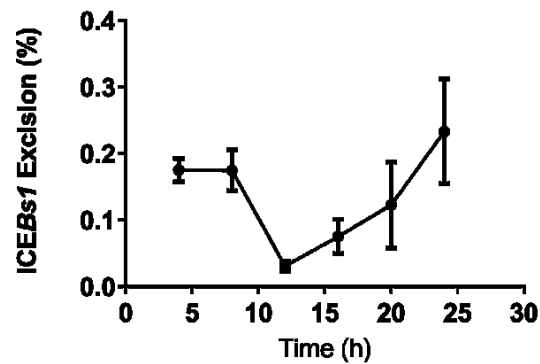


Figure S4. Biofilm does not affect *ICEBs1* excision over time. WT donor cells and *ICEBs1*⁰ *attB*-down recipient cells were mated on MSgg and donor *attB* site was amplified by qPCR after 4, 8, 12, 16 and 20 h at 30°C. We did not detect an increase in *ICEBs1* excision over time.

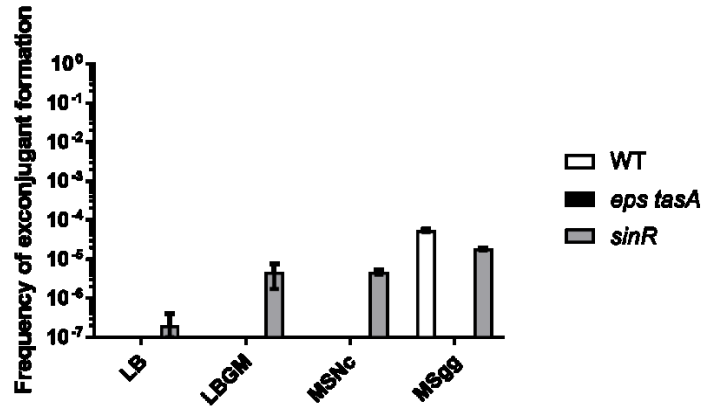


Figure S5. Conjugative transfer of *ICEBs1* is inefficient in shaking conditions. WT, *eps tasA* and *sinR* donor and recipient cells were mixed and inoculated in liquid LB, LBGM, MSNc and MSgg. Tubes were then incubated 20 h with shaking at 30°C, and exconjugant frequency was evaluated. Results shown are representative of at least three independent experiments and error bars represent the SEM.

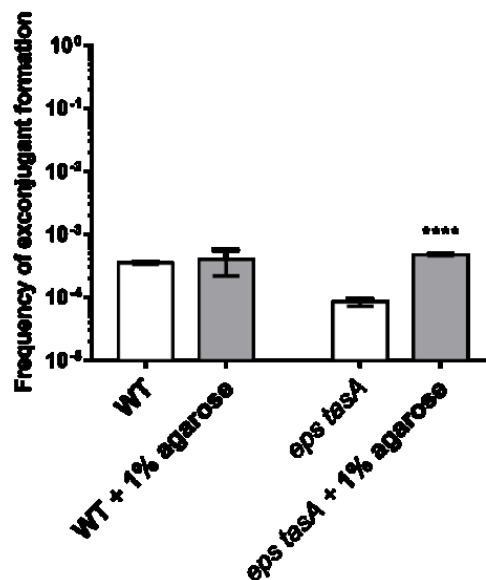


Figure S6. Polymers can act as a surrogate biofilm in absence of extracellular matrix.

WT cells and *epsA-O tasA* (*eps*) cells were resuspended in 1 % agarose and mated on MSNc. Mating efficiency was measured after 20 h at 30°C. Statistical analysis showed a significant increase in ICEBs1 transfer efficiency when agarose was added to *eps tasA* cells, but not for the WT cells (Student's t-Test, **** = $P < 0.0001$). Results shown are representative of at least three independent experiments and error bars represent the SEM.

Table S1. *recA* and WT donors cells count after 20 h.

	Concentration at 20 h (CFU/ml)
WT donors (FL62)	$6,93 \times 10^8 \pm 2,71 \times 10^8$
WT recipient (MG25)	$1,03 \times 10^9 \pm 3,56 \times 10^8$
<i>recA</i> donors (FL92)	$2,30 \times 10^7 \pm 2,00 \times 10^6$
WT recipient (MG25)	$1,33 \times 10^9 \pm 4,44 \times 10^7$

Table S2. *Bacillus subtilis* strains used

Strain	Genotype	Construction
168	Domesticated strain	Lab stock
3610	Wild type Undomesticated strain	Lab stock
VCL28	168 <i>ycbU-lmrB::spec</i>	See Methods
MG9	<i>immR::cat</i>	JMA208 ¹ in 3610
MG28	<i>ICEBsI-kan</i>	JMA348 ¹ in 3610
FL62	<i>ICEBsI-kan ycbU-lmrB::spec</i>	VCL28 in MG28
MG13	<i>ICEBsI</i> ⁰	JMA208 ¹ in 3610 and curing
MG25	<i>ICEBsI</i> ⁰ <i>ylnF/yboA::Tn917::amyE::cat</i>	PB514 [#] in MG13
FL66	<i>ICEBsI</i> ⁰ <i>comK::cat</i>	CAL419 ¹ in MG13
FL80	<i>ICEBsI-kan ycbU-lmrB::spec nicK::erm</i>	BKE04870 ² in FL62
FL83	<i>ICEBsI-kan ycbU-lmrB::spec cwlT::erm</i>	BKE04970 ² in FL62
FL104	<i>ICEBsI</i> ⁰ <i>comK::cat ycbU-lmrB::spec</i>	VCL28 in FL66

FL103	ICEBsI-kan <i>nicK::erm</i>	BKE04870 ² in MG28
FL105	ICEBsI-kan <i>nicK::erm comK::cat</i>	CAL419 ¹ in FL103
FL106	ICEBsI-kan <i>comK::cat</i>	CAL419 ¹ in MG28
FL91	(<i>rapI phrI</i>)342:: <i>kan ycbU-lmrB::spec</i>	CAL51 ¹ and VCL28 in 3610
FL92	ICEBsI-kan <i>ycbU-lmrB::spec recA::erm</i>	BKE16940 ² in FL62
FL96	(<i>rapI phrI</i>)342:: <i>kan ycbU-lmrB::spec recA::erm</i>	BKE16940 ² in FL91
FL63	ICEBsI-kan <i>amyE::PtapA-yfp</i>	CA018 ³ in MG28
FL60	ICEBsI ⁰ <i>ylnF/yboA::Tn917::amyE::cat lacA::PtapA-yfp</i>	DL821 ⁴ in MG25
JSB7	168 <i>attB</i> -down:: <i>erm</i>	See Methods
JSB18	ICEBsI ⁰ <i>attB</i> -down:: <i>erm</i>	This study
JSB19	ICEBsI-kan <i>ylnF/yloA::Tn917::amyE::cat</i>	PB514 [#] in MG28
FL93	ICEBsI-kan <i>sinR::spec</i>	PB194 [#] in MG28
FL94	ICEBsI ⁰ <i>ylnF/yboA::Tn917::amyE::cat sinR::spec</i>	PB194 [#] in MG25
MG44	ICEBsI-kan <i>tasA::erm epsA-O::tet</i>	SSB569 [#] in MG28
FL77	ICEBsI-kan <i>ycbU-lmrB::spec tasA::erm eps::tet</i>	VCL28 in MG44
MG43	ICEBsI ⁰ <i>ylnF/yboA::Tn917::amyE::cat tasA::erm epsA-O::tet</i>	SSB569 [#] in MG38
FL87	ICEBsI-kan <i>ycbU-lmrB::spec epsA-O::tet</i>	SSB569 [#] in FL62
FL90	ICEBsI ⁰ <i>ylnF/yboA::Tn917::amyE::cat epsA-O::tet</i>	SSB569 [#] in MG25
FL88	ICEBsI-kan <i>ycbU-lmrB::spec tasA::erm</i>	SSB569 [#] in FL62
MG38	ICEBsI ⁰ <i>ylnF/yboA::Tn917::amyE::cat tasA::erm</i>	SSB569 [#] in MG25

*Unless indicated, all strains are derivatives of *B. subtilis* NCIB 3610. Antibiotics: spectinomycin (spec), chloramphenicol (cat), erythromycin/lincomycin (erm), tetracycline (tet), kanamycin (kan).

#These strains come from the Kolter and/or Beauregard lab stock.

- 1- Auchtung, J. M., Lee, C. A., Monson, R. E., Lehman, A. P., Grossman, A. D. (2005) Regulation of a *B. subtilis* mobile genetic element by intercellular

- signaling and the global DNA damage response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 12554–12559.
- 2- Koo, B. M. *et al.* (2017) Construction and analysis of two genome-scale deletion libraries for *Bacillus subtilis*. *Cell Syst.* **4**, 291-305.e7.
 - 3- Vlamakis, H., Aguilar, C., Losick, R., Kolter, R. (2008) Control of cell fate by the formation of an architecturally complex bacterial community. *Genes & Dev.* **22**, 945-953.
 - 4- López, D., Vlamakis, H., Losick, R., Kolter, R. (2009) Cannibalism Enhances Biofilm Development in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **74**, 609-618.

Table S3. Donor and recipient cell counts in different media after 20 h.

	LB	LBGM	MSNc	MSgg
3610 ICEBsI- <i>kan ycbU-lmrB::spec</i> (Donors)	$3,97 \times 10^8 \pm 4,89 \times 10^7$	$1,00 \times 10^9 \pm 2,62 \times 10^8$	$3,60 \times 10^8 \pm 5,33 \times 10^7$	$9,27 \times 10^8 \pm 1,64 \times 10^8$
3610 ICEBsI ⁰ <i>ylnF/yboA::Tn917::amyE::cat</i> (Recipient)	$7,70 \times 10^8 \pm 2,20 \times 10^8$	$1,50 \times 10^9 \pm 4,00 \times 10^8$	$4,87 \times 10^8 \pm 3,11 \times 10^7$	$1,37 \times 10^9 \pm 1,78 \times 10^8$

Concentration is expressed in CFU/ml

CHAPITRE 3

L'INFILTRATION DU BIOFILM PAR ICE*BsI*

Dans la littérature, il semble y avoir un consensus que l'infiltration de MGE à travers un biofilm déjà établi est limitée à l'interface de contact entre les cellules donneuses et réceptrices (Christensen et al., 1996; Reisner et al., 2012; Seoane et al., 2011; Stalder and Top, 2016). Cependant, plusieurs de ces études étudiaient l'infiltration de MGE de colonies bactériennes attachées à une surface, sans qu'il y ait induction de la formation de biofilm. Ces connaissances ont ensuite été transposées à l'infiltration de biofilm attaché à une surface. Il semble donc y avoir dans la littérature une confusion entre biofilm et colonie sur agar. Nous avons donc voulu observer si l'infiltration de MGE était limitée lorsque le biofilm est déjà établi. Nous avons aussi étudié l'impact que le biofilm pouvait avoir sur l'infiltration, ainsi que les facteurs pouvant influencer cette infiltration. Nous avons alors utilisé notre modèle comprenant *B. subtilis* et son ICE, ICE*BsI*, ainsi que des milieux de culture induisant la formation de biofilm afin de répondre à ces questions.

3.1 Matériel et méthodes

La souche réceptrice a été inoculée dans 3 ml de LB et incubée pendant la nuit à 37°C. Ensuite, les cellules réceptrices ont été diluées à une DO₆₀₀ de 1.5. Les cellules ont ensuite été centrifugées à 5000 rpm pour 3 minutes. Le culot a été resuspendu dans un dixième du volume utilisé pour faire la dilution initiale et 10 µl ont été inoculés sur MSgg, pour être incubé 24 h à 30°C. En même temps, la souche donneuse a été inoculée dans 3 ml de LB et incubée pendant la nuit à 37°C et les cellules ont été traitées de la même manière que les cellules réceptrices en ce qui a trait à la dilution et la centrifugation. 10 µl de cellules

donneuses ont été inoculées à 3 mm du biofilm de cellules réceptrices déjà formé et l'incubation a été poursuivie pour 20 h à 30 °C (Figure 3.1). Ensuite, toutes les cellules ont été récoltées dans 1 ml de LB et soniquées 2 fois 20 sec avec une intensité de 30 % afin d'obtenir des cellules isolées. Pour certains essais, seulement une moitié du biofilm des réceptrices (celle éloignée des cellules donneuses) a été récoltée. Par la suite, les cellules ont été diluées et étalées sur LB avec antibiotique et ont été incubées pendant la nuit à 37 °C. Les CFUs ont ensuite été comptés afin d'obtenir le décompte de cellules donneuses, réceptrices et transconjugantes. L'efficacité de conjugaison a ensuite été calculée en divisant la concentration de cellules transconjugantes par la concentration de cellules réceptrices.

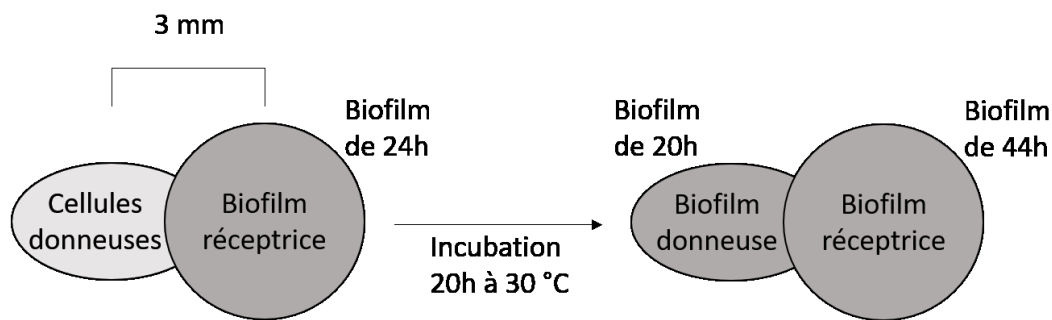


Figure 3.1 : Schéma illustrant l'expérience d'infiltration de biofilm déjà établi par *ICEBsI*.

3.2 Résultats

3.2.1 *ICEBsI* peut infiltrer un biofilm déjà formé.

Nous avons tout d'abord voulu observer si *ICEBsI* pouvait infiltrer un biofilm déjà établi. Pour ce faire, nous avons inoculé des cellules réceptrices sur MSgg pendant 24 h, afin de

leur permettre de former un biofilm robuste. Des cellules donneuses ont ensuite été inoculées à proximité, afin qu'il y ait un contact entre les deux colonies. L'efficacité de conjugaison a été déterminée 20 h après le contact initial. Nous avons pu observer qu'il y a une infiltration d'*ICEBsI* à travers le biofilm, indiqué par une efficacité de conjugaison de 10^{-3} (Figure 3.2). De manière surprenante, lorsqu'on isole la moitié du biofilm des réceptrices qui est éloignée de celui des donneuses, on peut aussi observer la présence de transconjugants, ce qui indique qu'*ICEBsI* peut se transférer en dehors de la zone de contact entre le biofilm des donneuses et des réceptrices (Figure 3.2). Cependant, le taux de conjugaison est beaucoup plus faible que ce que l'on observe lorsqu'on récolte le biofilm au complet, ce qui semble normal considérant la distance entre la zone de contact et la moitié récoltée. Donc, la zone de contact semble effectivement être l'endroit favorisant le plus le transfert conjugal.

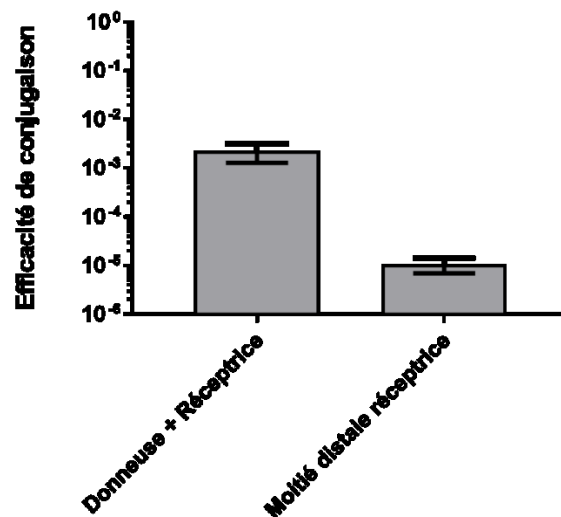


Figure 3.2 : *ICEBsI* est capable d'infiltrer un biofilm déjà établi, même dans la partie distale du biofilm des réceptrices. Des cellules donneuses WT ont été mises en contact avec des cellules réceptrices WT qui avaient déjà formé un biofilm sur MSgg. L'efficacité de conjugaison a été mesurée 20 h après le contact initial. *ICEBsI* est capable d'infiltrer un biofilm déjà établi et il y a du transfert même dans la partie distale du biofilm.

3.2.2 La production de matrice par les cellules réceptrices est importante pour l'infiltration d'*ICEBsI*.

Ensuite, nous avons voulu observer si la matrice du biofilm joue un rôle dans l'infiltration du biofilm par *ICEBsI*, comme c'est le cas lorsque les donneuses et les réceptrices sont mélangées ensemble (Figure 2.5). Pour ce faire, nous avons utilisé des donneuses et des réceptrices mutantes *eps tasA*, pour vérifier si la production de matrice était importante pour la réceptrice et/ou la donneuse. On peut observer que la production de matrice extracellulaire de la part des réceptrices est importante afin d'avoir une infiltration d'*ICEBsI* efficace (Figure 3.3). Il est aussi possible d'observer que l'absence de production de matrice par les donneuses n'a pas d'impact sur cette infiltration (Figure 3.3). Il est intéressant d'observer les parallèles entre ces observations et celles faites lorsque les donneuses et les réceptrices sont ensemble dans le même biofilm. En effet, dans les deux cas, la production de matrice par les réceptrices est essentielle pour un transfert optimal. Ces résultats mettent en lumière l'importance du biofilm et, en particulier, de la production de matrice extracellulaire par les réceptrices, pour une propagation efficace d'*ICEBsI*.

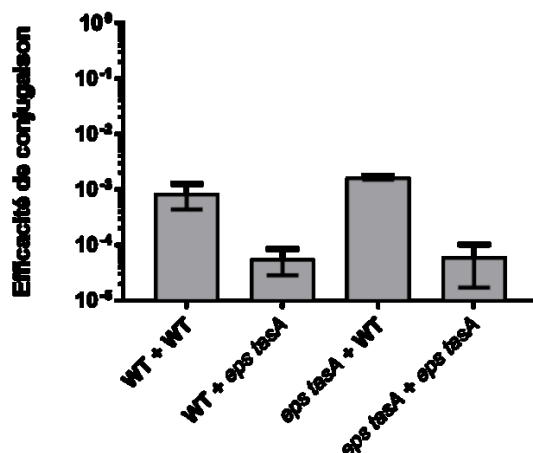


Figure 3.3 : La formation de biofilm de la réceptrice influence l'infiltration d'ICEBsI.

Des cellules donneuses WT et mutantes *eps tasA* ont été mises en contact avec des cellules réceptrices WT et mutantes *eps tasA* qui avaient préalablement formé un biofilm sur MSgg. L'efficacité de conjugaison a été mesurée 20 h après le contact initial. La production de matrice extracellulaire de la part des réceptrices semble essentielle pour un transfert optimal.

3.2.3 La concentration de donneuses influence l'infiltration d'ICEBsI.

Ensuite, nous avons voulu observer les facteurs pouvant influencer l'infiltration d'ICEBsI à travers le biofilm. Ainsi, nous avons étudié deux paramètres : le premier est la quantité des donneuses. Nous voulions observer si une plus faible initiale quantité de donneuses pouvait infiltrer aussi efficacement le biofilm, comme nous avons observé dans le chapitre précédent (Figure 2.2). Pour ce faire, nous avons dilué les cellules donneuses avant de les inoculer. Nous avons observé une hausse de la conjugaison à un ratio de donneuse : réceptrice de 1 : 10 comparativement au ratio 1 : 1 (Figure 3.4).

Le second paramètre que nous avons étudié est la motilité des cellules donneuses. En effet, nous voulions observer si la motilité des donneuses leur permettrait d'infiltrer le biofilm et ainsi transférer *ICEBsI* à partir de l'intérieur du biofilm, ce qui biaiserait le taux de conjugaison que nous observons pour l'infiltration. Nous avons donc utilisé des donneuses mutantes pour le gène *hag*. Ce gène code pour la flagelline, qui est la sous-unité structurelle de la flagelle et est donc essentiel pour la motilité (Mukherjee and Kearns, 2014). Cependant, nous n'observons pas de différence dans le transfert d'*ICEBsI* lorsque les donneuses ne sont pas motiles (Figure 3.4). Si les donneuses pouvaient infiltrer elles-mêmes le biofilm des réceptrices pour y propager *ICEBsI*, nous aurions observé une diminution du transfert. Donc, la quantité de cellules donneuses, mais pas leur motilité, peut influencer l'infiltration d'*ICEBsI* à travers le biofilm.

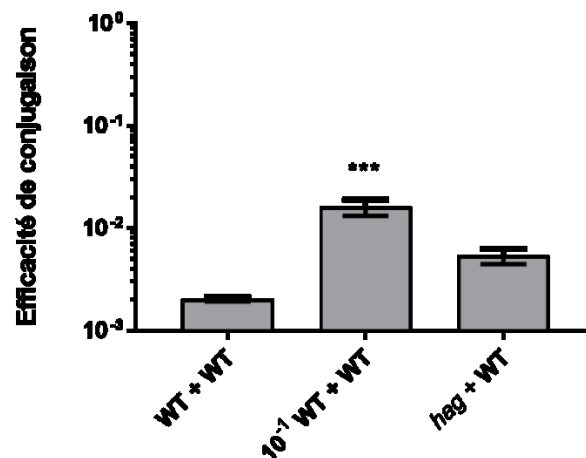


Figure 3.4 : Une diminution de donneuses, mais pas leur motilité, influence l'infiltration d'*ICEBsI*. Des cellules donneuses WT, diluées ou non, et mutantes *hag* ont été mises en contact avec des cellules réceptrices WT qui avaient préalablement formé un biofilm. L'efficacité de conjugaison a été mesurée 20 h après le contact initial. La quantité de donneuses, mais pas leur motilité, affecte l'infiltration d'*ICEBsI*. (One-way ANOVA, *** = $P < 0.001$)

CHAPITRE 4

DISCUSSION ET CONCLUSION GÉNÉRALE

4.1 L'importance des exopolysaccharides

Nous avons démontré que la production d'exopolysaccharides par la réceptrice était importante pour un transfert optimal d'*ICEBsI* en biofilm. Cependant, qu'est-ce qui pourrait expliquer cette importance de la production d'exopolysaccharides, tandis que la production de fibres amyloïdes semble avoir moins d'impact? Un facteur pouvant expliquer cette importance pourrait être la capacité de *B. subtilis* à former des chaînes de bactéries en biofilm. En effet, *ICEBsI* est capable d'être transféré efficacement à travers ces structures bactériennes (Branda et al., 2001) (Babic et al., 2011). Cependant, les simples mutants *eps* ou *tasA* sont aussi capable de former des chaînes bactériennes, mais celles-ci sont beaucoup moins compactes que celles de cellules WT (Branda et al., 2006). Donc, il serait possible que la production d'exopolysaccharides de la part des réceptrices permet de rapprocher les différentes chaînes et ainsi d'imiter le phénotype des cellules WT, ce qui ne serait pas possible par les fibres amyloïdes seules.

4.2 Régulation commune entre la formation de biofilm et le transfert d'*ICEBsI*

Nous avons pu observer que la formation de biofilm et le transfert d'*ICEBsI* sont activés simultanément dans le temps. Un aspect intéressant concernant cette activation simultanée est la présence de régulateurs communs entre ces deux phénomènes. En effet, il est hypothétisé qu'à basse densité cellulaire, l'expression de *rapI* est réprimée par le régulateur de transition de phase AbrB (Auchtung et al., 2016). AbrB est aussi un des répresseurs de

l'expression des opérons *epsA-O* et *tapA-sipW-tasA* (Chumsakul et al., 2011). Ainsi, le transfert d'*ICEBsI* et la formation de biofilm seront tous deux inhibés lors de la phase stationnaire. ComA est un autre régulateur commun entre ces deux phénomènes. En effet, il existe sur *ICEBsI* des sites de liaison non canoniques de ComA dans les régions promotrices de *rapI* et *yddK*, et ComA est capable d'activer l'expression de ces deux gènes (Wolf et al., 2016). Cependant, il n'est pas encore connu si ComA peut activer le transfert d'*ICEBsI* par l'activation de l'expression de *rapI*. ComA est aussi responsable d'activer l'expression des gènes de l'opéron *srfA*, qui sont responsables de la production de surfactine (Nakano et al., 1991). La surfactine peut activer KinC en causant une fuite de potassium, entraînant ainsi la cascade de signalisation menant à l'activation des opérons *epsA-O* et *tapA-sipW-tasA* (Lopez et al., 2009b). Cependant, malgré la présence de ces régulateurs communs, le taux d'excision d'*ICEBsI* n'est pas diminué lorsqu'il n'y a pas de formation de biofilm (Figure 2.4). Il se pourrait donc qu'il y ait un activateur de l'expression de *rapI* jusqu'ici inconnu et qui activerait l'expression de *rapI* sans avoir de rôle à jouer dans la régulation de la formation de biofilm. Cet activateur expliquerait que le taux d'excision d'*ICEBsI* soit semblable avec ou sans formation de biofilm.

4.3 Infiltration du biofilm

Les résultats observés en ce qui a trait à l'infiltration de biofilm par *ICEBsI* sont intéressants. En effet, le niveau de transfert lors de l'infiltration est environ 10 fois moins élevé que lorsque les donneuses et les réceptrices sont mélangées ensemble dans le même biofilm. Il est souvent observé que les MGEs ne se propagent pas au-delà d'environ trois couches de cellules (Stalder and Top, 2016). En fait, très peu d'études ont observé la propagation d'un élément conjugatif au-delà de la zone de contact entre donneuses et réceptrices (Bahl et al., 2007). Si *ICEBsI* était incapable de se propager dans le biofilm, nous n'aurions pas retrouvé de transconjugants dans la partie du biofilm opposée aux donneuses (Figure 3.1). Un aspect encourageant cette infiltration pourrait être la formation

de chaînes bactériennes dans le biofilm des réceptrices. Ainsi, la première couche de cellules réceptrices pourrait acquérir *ICEBsI*, pour ensuite le transférer efficacement à travers ces chaînes dans le biofilm (Babic et al., 2011). Puisque ce n'est pas toutes les espèces bactériennes qui forment des chaînes comme *B. subtilis* en biofilm, cela pourrait expliquer le manque de propagation observé dans le biofilm chez d'autres espèces bactériennes (Serra et al., 2013). De plus, même s'il y avait formation de chaînes bactériennes, il se pourrait que les éléments conjugatifs présents ne se transmettent pas aussi efficacement à travers celles-ci qu'*ICEBsI*. Une autre observation intéressante est l'effet de la concentration de donneuse sur l'infiltration d'*ICEBsI* en comparaison à lorsque les donneuses et réceptrices sont dans le même biofilm. En effet, dans les deux cas, on observe environ dix fois plus de transfert lorsqu'on a 10 fois moins de donneuses (Figure 2.2 et Figure 3.3). Ainsi, il semble que même si les donneuses ne sont pas mélangées avec les réceptrices, la baisse de la quantité de donneuses est suffisante pour atténuer l'effet inhibiteur de PhrI sur RapI, et que les réceptrices à proximité n'influencent pas cette régulation. Cependant, on observait parfois qu'en inoculant les donneuses, les cellules pouvaient couler sous le biofilm et on pouvait en dénombrer dans la partie distale du biofilm des réceptrices. Il serait possible que ces donneuses pourraient biaiser les résultats, mais d'autres essais dans lesquelles les donneuses se trouvaient exclusivement sous le biofilm ont été effectués et aucun transfert n'a été observé. Donc, il est peu probable que ces donneuses aient un impact significatif sur les résultats obtenus.

4.4 Perspectives et conclusions

En conclusion, au cours de ma maîtrise, nous avons pu montrer que le biofilm pouvait augmenter de 100 à 10 000 fois le transfert conjugatif d'*ICEBsI*. Cette augmentation est due à la production de matrice extracellulaire de la part de la réceptrice, qui va amener à un meilleur contact cellule-cellule, et non à une augmentation de l'activité des voies responsables de l'activation de l'excision et du transfert d'*ICEBsI*. Nous avons aussi

montré qu'*ICEBsI* était capable d'infiltrer un biofilm déjà établi et que la matrice extracellulaire était importante pour une infiltration optimale. Nous avons donc mis en évidence l'impact du biofilm sur le transfert de MGE portant couramment des gènes de résistance aux antibiotiques. Il sera donc important de prendre le biofilm en compte lorsque d'éventuelles solutions seront développées pour combattre la dissémination de résistances aux antibiotiques et la résistance multiple. Le biofilm est aussi un élément à prendre en considération lors de futures études sur des ICEs de bactéries à Gram positif, étant donné leur taux de transfert généralement peu élevé.

En perspective, il serait intéressant de construire une donneuse fluorescente, en insérant un gène codant pour une protéine fluorescente sur *ICEBsI*. Ainsi, il serait possible d'observer la dynamique du transfert d'*ICEBsI* en biofilm à travers le temps, que ce soit dans les biofilms mixtes ou pour l'infiltration. De plus, cela permettrait de voir l'impact des donneuses qui se glissent sous le biofilm lors des essais d'infiltration. Aussi, en utilisant des souches réceptrices ayant une construction P_{tapA} -*yfp* et un gène exprimant constitutivement une protéine fluorescente conjointement à cette donneuse fluorescente, il serait possible d'observer si les cellules produisant la matrice extracellulaire sont plus susceptibles d'acquérir *ICEBsI* comparativement à celles qui n'en produisent pas. Il serait aussi intéressant d'étudier les gènes qui restent encore à ce jour non caractérisés sur *ICEBsI*. Effectivement, peut-être qu'un de ces gènes code pour une protéine apportant un avantage à *B. subtilis* dans l'environnement. Ainsi, on pourrait finalement associer une fonction à *ICEBsI*, autre que de mobiliser des plasmides non mobilisables.

Un autre aspect qui serait intéressant à étudier serait l'impact des chaînes de bactéries sur le transfert en biofilm. En effet, il serait possible d'obtenir un biofilm normal dans lequel les cellules ne forment pas de chaînes, en utilisant une souche surexprimant un des gènes codant pour une autolysine responsable de la séparation des cellules suite à la division cellulaire. Ainsi, il serait possible de comparer l'efficacité de transfert d'*ICEBsI* dans un

biofilm sans chaîne cellulaire à un biofilm de cellules WT et observer l'importance des chaînes cellulaires pour le transfert d'*ICEBsI* en biofilm, que ce soit pour lorsque les donneuses et les réceptrices dans le même biofilm ou pour l'infiltration d'un biofilm déjà établi. Malgré le travail qui a été accompli, il persiste donc encore plusieurs questions à répondre afin de mieux comprendre le transfert de MGE en biofilm.

BIBLIOGRAPHIE

Allard-Massicotte R, Tessier L, Lécuyer F, Lakshmanan V, Lucier JF, Garneau D, Caudwell L, Vlamakis H, Bais HP, Beauregard PB. (2016). *Bacillus subtilis* early colonization of *Arabidopsis thaliana* roots involves multiple chemotaxis receptors. MBio 7, e01664-16.

Alvarez-Martinez, C.E., and Christie, P.J. (2009). Biological diversity of prokaryotic type IV secretion systems. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 73, 775–808.

Aminov, R.I. (2011). Horizontal gene exchange in environmental microbiota. Front. Microbiol. 2, 158.

Auchtung JM, Lee CA, Monson RE, Lehman AP, Grossman AD. (2005). Regulation of a *Bacillus subtilis* mobile genetic element by intercellular signaling and the global DNA damage response. Proc. Natl. Acad. Sci. 102, 12554–12559.

Auchtung, J.M., Lee, C.A., Garrison, K.L., and Grossman, A.D. (2007). Identification and characterization of the immunity repressor (ImmR) that controls the mobile genetic element ICEBs1 of *Bacillus subtilis*. Mol. Microbiol. 64, 1515–1528.

Auchtung, J.M., Aleksanyan, N., Bulku, A., and Berkmen, M.B. (2016). Biology of ICEBs1, an integrative and conjugative element in *Bacillus subtilis*. Plasmid 86, 14–25.

Babic, A., Berkmen, M.B., Lee, C.A., and Grossman, A.D. (2011). Efficient gene transfer in bacterial cell chains. MBio 2, e00027-11.

Bahl, M.I., Hansen, L.H., and Sørensen, S.J. (2007). Impact of conjugal transfer on the stability of IncP-1 plasmid pKJK5 in bacterial populations. FEMS Microbiol. Lett. 266, 250–256.

Banse, A. V., Chastanet, A., Rahn-Lee, L., Hobbs, E.C., and Losick, R. (2008). Parallel pathways of repression and antirepression governing the transition to stationary phase in *Bacillus subtilis*. Proc. Natl. Acad. Sci. 105, 15547–15552.

Beauregard, P.B., Chai, Y., Vlamakis, H., Losick, R., and Kolter, R. (2013). *Bacillus subtilis* biofilm induction by plant polysaccharides. Proc. Natl. Acad. Sci. 110, E1621–E1630.

Berkmen, M.B., Lee, C.A., Loveday, E.K., and Grossman, A.D. (2010). Polar positioning of a conjugation protein from the integrative and conjugative element ICEBs1 of *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 192, 38–45.

Bhatty, M., Laverde Gomez, J.A., and Christie, P.J. (2013). The expanding bacterial type IV secretion lexicon. Res. Microbiol. 164, 620–639.

Bhatty, M., Cruz, M.R., Frank, K.L., Laverde Gomez, J.A., Andrade, F., Garsin, D.A.,

- Dunny, G.M., Kaplan, H.B., and Christie, P.J. (2015). *Enterococcus faecalis* pCF10-encoded surface proteins PrgA, PrgB (aggregation substance) and PrgC contribute to plasmid transfer, biofilm formation and virulence. *Mol. Microbiol.* 95, 660–677.
- Bose, B., and Grossman, A.D. (2011). Regulation of horizontal gene transfer in *Bacillus subtilis* by activation of a conserved site-specific protease. *J. Bacteriol.* 193, 22–29.
- Bose, B., Auchtung, J.M., Lee, C.A., and Grossman, A.D. (2008). A conserved anti-repressor controls horizontal gene transfer by proteolysis. *Mol. Microbiol.* 70, 570–582.
- Branda, S.S., Gonzalez-Pastor, J.E., Ben-Yehuda, S., Losick, R., and Kolter, R. (2001). Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 11621–11626.
- Branda, S.S., Gonzalez-Pastor, J.E., Dervyn, E., Ehrlich, S.D., Losick, R., and Kolter, R. (2004). Genes involved in formation of structured multicellular communities by *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 186, 3970–3979.
- Branda, S.S., Vik, Å., Friedman, L., and Kolter, R. (2005). Biofilms: The matrix revisited. *Trends Microbiol.* 13, 20–26.
- Branda, S.S., Chu, F., Kearns, D.B., Losick, R., and Kolter, R. (2006). A major protein component of the *Bacillus subtilis* biofilm matrix. *Mol. Microbiol.* 59, 1229–1238.
- Burmølle, M., Bahl, M.I., Jensen, L.B., Sørensen, S.J., and Hansen, L.H. (2008). Type 3 fimbriae, encoded by the conjugative plasmid pOLA52, enhance biofilm formation and transfer frequencies in *Enterobacteriaceae* strains. *Microbiology* 154, 187–195.
- Burrus, V., Pavlovic, G., Decaris, B., and Guédon, G. (2002). The ICE*StI* element of *Streptococcus thermophilus* belongs to a large family of integrative and conjugative elements that exchange modules and change their specificity of integration. *Plasmid* 48, 77–97.
- Carraro, N., and Burrus, V. (2014). Biology of Three ICE Families: SXT/R391, ICE*BsI*, and ICE*StI*/ICE*St3*. *Microbiol. Spectr.* 2, MDNA3-0008-2014.
- Chai, Y., Kolter, R., and Losick, R. (2009). Paralogous antirepressors acting on the master regulator for biofilm formation in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 74, 876–887.
- Chai, Y., Norman, T., Kolter, R., and Losick, R. (2010a). An epigenetic switch governing daughter cell separation in *Bacillus subtilis*. *Genes Dev.* 24, 754–765.
- Chai, Y., Kolter, R., and Losick, R. (2010b). Reversal of an epigenetic switch governing cell chaining in *Bacillus subtilis* by protein instability. *Mol. Microbiol.* 78, 218–229.
- Chen, Y., Cao, S., Chai, Y., Clardy, J., Kolter, R., Guo, J.H., and Losick, R. (2012). A *Bacillus subtilis* sensor kinase involved in triggering biofilm formation on the roots of tomato plants. *Mol. Microbiol.* 85, 418–430.
- Christensen, B.B., Sternberg, C., and Molin, S. (1996). Bacterial plasmid conjugation on semi-solid surfaces monitored with the green fluorescent protein (GFP) from *Aequorea*

victoria as a marker. *Gene* 173, 59–65.

Christie, P.J. (1997). *Agrobacterium tumefaciens* T-Complex transport apparatus: A paradigm for a new family of multifunctional transporters in eubacteria. *J. Bacteriol.* 179, 3085–3094.

Christie, P.J. (2016). The mosaic type IV secretion systems. *EcoSal Plus* 7, ESP-0020-2015.

Chumsakul, O., Takahashi, H., Oshima, T., Hishimoto, T., Kanaya, S., Ogasawara, N., and Ishikawa, S. (2011). Genome-wide binding profiles of the *Bacillus subtilis* transition state regulator AbrB and its homolog Abh reveals their interactive role in transcriptional regulation. *Nucleic Acids Res.* 39, 414–428.

Colavecchio, A., Cadieux, B., Lo, A., and Goodridge, L.D. (2017). Bacteriophages contribute to the spread of antibiotic resistance genes among foodborne pathogens of the *Enterobacteriaceae* family - A review. *Front. Microbiol.* 8, 1–13.

Costerton J, Lewandowski Z, Caldwell D, Korber D, and Lappin-Scott H (1995). Microbial Biofilms. *Annu Rev Microbiol* 49, 711–745.

Delavat, F., Miyazaki, R., Carraro, N., Pradervand, N., and van der Meer, J.R. (2017). The hidden life of integrative and conjugative elements. *FEMS Microbiol. Rev.* 41, 512–537.

DeWitt, T., and Grossman, A.D. (2014). The bifunctional cell wall hydrolase CwlT is needed for conjugation of the integrative and conjugative element ICEBs1 in *Bacillus subtilis* and *B. anthracis*. *J. Bacteriol.* 196, 1588–1596.

Earl, A.M., Losick, R., and Kolter, R. (2007). *Bacillus subtilis* genome diversity. *J. Bacteriol.* 189, 1163–1170.

Finan, T.M. (2002). Evolving insights: Symbiosis islands and horizontal gene transfer. *J. Bacteriol.* 184, 2855–2856.

Fox, R.E., Zhong, X., Krone, S.M., and Top, E.M. (2008). Spatial structure and nutrients promote invasion of IncP-1 plasmids in bacterial populations. *ISME J.* 2, 1024–1039.

Franke, A.E., and Clewell, D.B. (1981). Evidence for a chromosome-borne resistance transposon (Tn916) in *Streptococcus faecalis* that is capable of “conjugal” transfer in the absence of a conjugative plasmid. *J. Bacteriol.* 145, 494–502.

Fujita, M., Gonzalez-Pastor, J.E., and Losick, R. (2005). High- and low-threshold genes in the Spo0A regulon of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 187, 1357–1368.

Grau, R.R., Oña, P. De, Kunert, M., Leñini, C., Gallegos-monterrosa, R., Mhatre, E., and Vileta, D. (2015). A duo of potassium-responsive histidine kinases govern the multicellular destiny of *Bacillus subtilis*. *MBio.* 6, e00581-15.

Grohmann, E., Christie, P.J., Waksman, G., and Backert, S. (2018). Type IV secretion in Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* 107, 455–471.

- Guglielmini, J., Quintais, L., Garcillán-Barcia, M.P., de la Cruz, F., and Rocha, E.P.C. (2011). The repertoire of ICE in prokaryotes underscores the unity, diversity, and ubiquity of conjugation. *PLoS Genet.* 7, e1002222.
- Haaber, J., Penadés, J.R., and Ingmer, H. (2017). Transfer of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.* 25, 893–905.
- Haagensen, J.A.J., Hansen, S.K., Johansen, T., and Molin, S. (2002). *In situ* detection of horizontal transfer of mobile genetic elements. *FEMS Microbiol. Ecol.* 42, 261–268.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W., and Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 95–108.
- Hausner, M., and Wuertz, S. (1998). High rates of conjugation in bacterial biofilms as determined by quantitative *in situ* analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3710–3713.
- He, J., Baldini, R.L., Deziel, E., Saucier, M., Zhang, Q., Liberati, N.T., Lee, D., Urbach, J., Goodman, H.M., and Rahme, L.G. (2004). The broad host range pathogen *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 carries two pathogenicity islands harboring plant and animal virulence genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 2530–2535.
- Hemme, C.L., Green, S.J., Rishishwar, L., Prakash, O., Pettenato, A., Chakraborty, R., Deutschbauer, A.M., Van Nostrand, J.D., Wu, L., He, Z., et al. (2016). Lateral gene transfer in a heavy metal-contaminated-groundwater microbial community. *MBio* 7, e02234-15.
- Hirt, H., Manias, D.A., Bryan, E.M., Klein, J.R., Marklund, J.K., Staddon, J.H., Paustian, M.L., Kapur, V., and Dunny, G.M. (2005). Characterization of the pheromone response of the *Enterococcus faecalis* conjugative plasmid pCF10: complete sequence and comparative analysis of the transcriptional and phenotypic responses of pCF10-containing cells to pheromone induction. *J. Bacteriol.* 187, 1044–1054.
- Jiang, M., Shao, W., Perego, M., and Hoch, J.A. (2000). Multiple histidine kinases regulate entry into stationary phase and sporulation in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 38, 535–542.
- Johnson, C.M., and Grossman, A.D. (2015). Integrative and conjugative elements (ICEs): What they do and how they work. *Annu. Rev. Genet.* 49, 577–601.
- Johnson, C.M., and Grossman, A.D. (2016). The composition of the cell envelope affects conjugation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 198, 1241–1249.
- Jung, W.J., Mabood, F., Souleimanov, A., Whyte, L.G., Niederberger, T.D., and Smith, D.L. (2014). Antibacterial activity of antagonistic bacterium *Bacillus subtilis* DJM-51 against phytopathogenic *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense* ATCC 7429 *in vitro*. *Microb. Pathog.* 77, 13–16.
- Kobayashi, K., and Iwano, M. (2012). BslA (YuaB) forms a hydrophobic layer on the surface of *Bacillus subtilis* biofilms. *Mol. Microbiol.* 85, 51–66.

- Krüger, N.-J., and Stingl, K. (2011). Two steps away from novelty - principles of bacterial DNA uptake. *Mol. Microbiol.* *80*, 860–867.
- Lastochkina, O., Pusenkova, L., Yuldashev, R., Babaev, M., Garipova, S., Blagova, D., Khairullin, R., and Aliniaefard, S. (2017). Effects of *Bacillus subtilis* on some physiological and biochemical parameters of *Triticum aestivum* L. (wheat) under salinity. *Plant Physiol. Biochem.* *121*, 80–88.
- Leclercq, R. (2002). Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clin. Infect. Dis.* *34*, 482–492.
- Lee, C.A., and Grossman, A.D. (2007). Identification of the origin of transfer (*oriT*) and DNA relaxase required for conjugation of the integrative and conjugative element ICEBsI of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* *189*, 7254–7261.
- Lee, C.A., Auchtung, J.M., Monson, R.E., and Grossman, A.D. (2007). Identification and characterization of *int* (integrase), *xis* (excisionase) and chromosomal attachment sites of the integrative and conjugative element ICEBsI of *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* *66*, 1356–1369.
- Lee, C.A., Babic, A., and Grossman, A.D. (2010). Autonomous plasmid-like replication of a conjugative transposon. *Mol. Microbiol.* *75*, 268–279.
- Lee, C.A., Thomas, J., and Grossman, A.D. (2012). The *Bacillus subtilis* conjugative transposon ICEBsI mobilizes plasmids lacking dedicated mobilization functions. *J. Bacteriol.* *194*, 3165–3172.
- Leonetti, C.T., Hamada, M.A., Laurer, S.J., Broulidakis, M.P., Swerdlow, K.J., Lee, C.A., Grossman, A.D., and Berkmen, M.B. (2015). Critical components of the conjugation machinery of the integrative and conjugative element ICEBsI of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* *197*, 2558–2567.
- Levy, S.B., and Bonnie, M. (2004). Antibacterial resistance worldwide: Causes, challenges and responses. *Nat. Med.* *10*, S122–S129.
- Llosa, M., Gomis-Rüth, F.X., Coll, M., and De la Cruz, F. (2002). Bacterial conjugation: A two-step mechanism for DNA transport. *Mol. Microbiol.* *45*, 1–8.
- Lopez, D., Vlamakis, H., and Kolter, R. (2009a). Generation of multiple cell types in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Rev.* *33*, 152–163.
- Lopez, D., Fischbach, M.A., Chu, F., Losick, R., and Kolter, R. (2009b). Structurally diverse natural products that cause potassium leakage trigger multicellularity in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *106*, 280–285.
- Madsen, J.S., Burmølle, M., Hansen, L.H., and Sørensen, S.J. (2012). The interconnection between biofilm formation and horizontal gene transfer. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* *65*, 183–195.

- McCarthy, H., Rudkin, J.K., Black, N.S., Gallagher, L., O'Neill, E., and O'Gara, J.P. (2015). Methicillin resistance and the biofilm phenotype in *Staphylococcus aureus*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 5, 1–9.
- McDougald, D., Rice, S.A., Barraud, N., Steinberg, P.D., and Kjelleberg, S. (2012). Should we stay or should we go: Mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 39–50.
- McLoon, A.L., Guttenplan, S.B., Kearns, D.B., Kolter, R., and Losick, R. (2011). Tracing the domestication of a biofilm-forming bacterium. *J. Bacteriol.* 193, 2027–2034.
- Menard, K.L., and Grossman, A.D. (2013). Selective pressures to maintain attachment site specificity of integrative and conjugative elements. *PLoS Genet.* 9, 1–14.
- Mielich-Süss, B., and Lopez, D. (2015). Molecular mechanisms involved in *Bacillus subtilis* biofilm formation. *Environ. Microbiol.* 17, 555–565.
- Miyazaki, R., Minoia, M., Pradervand, N., Sulser, S., Reinhard, F., and van der Meer, J.R. (2012). Cellular variability of RpoS expression underlies subpopulation activation of an integrative and conjugative element. *PLoS Genet.* 8, e1002818.
- Mukherjee, S., and Kearns, D.B. (2014). The Structure and Regulation of Flagella in *Bacillus subtilis*. *Annu. Rev. Genet.* 48, 319–340.
- Nakano, M.M., Xia, L.A., and Zuber, P. (1991). Transcription initiation region of the *srfA* operon, which is controlled by the compP-comA signal transduction system in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 173, 5487–5493.
- Newman, J.A., and Lewis, R.J. (2013). Exploring the role of SlrR and SlrA in the SinR epigenetic switch. *Commun. Integr. Biol.* 6, 9–12.
- Ochman, H., Lawrence, J.G., and Groisman, E.A. (2000). Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* 405, 299–304.
- Pottahil, M., and Lazazzera, B.A. (2003). The extracellular Phr peptide-Rap phosphatase signaling circuit of *Bacillus subtilis*. *Front. Biosci.* 8, 32–45.
- Ramsay, J.P., Sullivan, J.T., Jambari, N., Ortori, C.A., Heeb, S., Williams, P., Barrett, D.A., Lamont, L.L., and Ronson, C.W. (2009). A LuxRI-family regulatory system controls excision and transfer of the *Mesorhizobium loti* strain R7A symbiosis island by activating expression of two conserved hypothetical genes. *Mol. Microbiol.* 73, 1141–1155.
- Reisner, A., Wolinski, H., and Zechner, E.L. (2012). In situ monitoring of IncF plasmid transfer on semi-solid agar surfaces reveals a limited invasion of plasmids in recipient colonies. *Plasmid* 67, 155–161.
- Romero, D., Aguilar, C., Losick, R., and Kolter, R. (2010). Amyloid fibers provide structural integrity to *Bacillus subtilis* biofilms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 2230–2234.
- Romero, D., Vlamakis, H., Losick, R., and Kolter, R. (2011). An accessory protein required

for anchoring and assembly of amyloid fibres in *B. subtilis* biofilms. *Mol. Microbiol.* *80*, 1155–1168.

Roux, D., Cywes-Bentley, C., Zhang, Y.F., Pons, S., Konkol, M., Kearns, D.B., Little, D.J., Howell, P.L., Skurnik, D., and Pier, G.B. (2015). Identification of Poly-N-acetylglucosamine as a major polysaccharide component of the *Bacillus subtilis* biofilm matrix. *J. Biol. Chem.* *290*, 19261–19272.

Scornec, H., Bellanger, X., Guillotteau, H., Groshenry, G., and Merlin, C. (2017). Inducibility of Tn916 conjugative transfer in *Enterococcus faecalis* by subinhibitory concentrations of ribosome-targeting antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.* *72*, 2722–2728.

Seoane, J., Yankelevich, T., Dechesne, A., Merkey, B., Sternberg, C., and Smets, B.F. (2011). An individual-based approach to explain plasmid invasion in bacterial populations. *FEMS Microbiol. Ecol.* *75*, 17–27.

Serra, D.O., Richter, A.M., and Klauck, G. (2013). Microanatomy at cellular resolution and spatial order of physiological differentiation in a bacterial biofilm. *MBio* *4*, e00103-13.

Shemesh, M., and Chai, Y. (2013). A combination of glycerol and manganese promotes biofilm formation in *Bacillus subtilis* via histidine kinase KinD signaling. *J. Bacteriol.* *195*, 2747–2754.

Silver, L.L. (2011). Challenges of antibacterial discovery revisited. *Clin. Microbiol. Rev.* *24*, 71–109.

Smyth, D.S., and Robinson, D.A. (2009). Integrative and sequence characteristics of a novel genetic element, ICE6013, in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* *191*, 5964–5975.

Solheim, H.T., Sekse, C., Urdahl, A.M., Wasteson, Y., and Nesse, L.L. (2013). Biofilm as an environment for dissemination of *stx* genes by transduction. *Appl. Environ. Microbiol.* *79*, 896–900.

Stalder, T., and Top, E. (2016). Plasmid transfer in biofilms: a perspective on limitations and opportunities. *Npj Biofilms Microbiomes* *2*, 16022.

Stöver, A.G., and Driks, A. (1999). Control of synthesis and secretion of the *Bacillus subtilis* protein YqxM. *J. Bacteriol.* *181*, 7065–7069.

Strauch, M., Webb, V., Spiegelman, G., and Hoch, J.A. (1990). The SpoOA protein of *Bacillus subtilis* is a repressor of the *abrB* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *87*, 1801–1805.

Tahir, H.A.S., Gu, Q., Wu, H., Raza, W., Hanif, A., Wu, L., Colman, M. V., and Gao, X. (2017). Plant growth promotion by volatile organic compounds produced by *Bacillus subtilis* SYST2. *Front. Microbiol.* *8*, 1–11.

Tan, I.S., and Ramamurthi, K.S. (2014). Spore formation in *Bacillus subtilis*. *Environ.*

Microbiol. Rep. 6, 212–225.

Tanner, W.D., Atkinson, R.M., Goel, R.K., Toleman, M.A., Benson, L.S., Porucznik, C.A., and VanDerslice, J.A. (2017). Horizontal transfer of the *bla*_{NDM-1} gene to *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in biofilms. FEMS Microbiol. Lett. 364, 22–25.

Tatum, E.L., and Lederberg, J. (1947). Gene recombination in the bacterium *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 53, 673–684.

Thanassi, D.G., Bliska, J.B., and Christie, P.J. (2012). Surface organelles assembled by secretion systems of Gram-negative bacteria: Diversity in structure and function. FEMS Microbiol. Rev. 36, 1046–1082.

Thomas, J., Lee, C.A., and Grossman, A.D. (2013). A conserved helicase processivity factor is needed for conjugation and replication of an integrative and conjugative element. PLoS Genet. 9, e1003198.

Vlamakis, H., Chai, Y., Beauregard, P., Losick, R., and Kolter, R. (2013). Sticking together: Building a biofilm the *Bacillus subtilis* way. Nat. Rev. Microbiol. 11, 157–168.

Wiling, J.N., Zaburdaev, V., De Volder, M., Losick, R., Brenner, M.P., and Weitz, D.A. (2013). Liquid transport facilitated by channels in *Bacillus subtilis* biofilms. Proc. Natl. Acad. Sci. 110, 848–852.

Wilson, D.N. (2014). Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. Nat. Rev. Microbiol. 12, 35–48.

Wolf, D., Rippa, V., Mobarec, J.C., Sauer, P., Adlung, L., Kolb, P., and Bischofs, I.B. (2016). The quorum-sensing regulator ComA from *Bacillus subtilis* activates transcription using topologically distinct DNA motifs. Nucleic Acids Res. 44, 2160–2172.

Wright, G.D. (2005). Bacterial resistance to antibiotics: Enzymatic degradation and modification. Adv. Drug Deliv. Rev. 57, 1451–1470.

Wright, L.D., and Grossman, A.D. (2016). Autonomous Replication of the Conjugative Transposon Tn916. J. Bacteriol. 198, 3355–3366.

Wright, L.D., Johnson, C.M., and Grossman, A.D. (2015). Identification of a single strand origin of replication in the integrative and conjugative element ICEBs1 of *Bacillus subtilis*. PLoS Genet. 11, e1005556.

